

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ana PENKO

**VPLIV RASTLINSKIH EKSTRAKTOV NA ZMANJŠANJE
VSEBNOSTI HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV IN
OKSIDOV HOLESTEROLA V TOPLOTNO OBDELANEM
PIŠČANČJEM MESU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE EFFECT OF PLANT EXTRACTS ON HETEROCYCLIC
AROMATIC AMINES AND CHOLESTEROL OXIDES REDUCTION
IN THERMALLY TREATED CHICKEN MEAT**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Popravki:

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 19.9.2012, je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje živilstvo. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Lea Demšar, za somentorico pa doc. dr. Bojana Žegura.

Doktorska disertacija je bila opravljena na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani in Nacionalnem inštitutu za Biologijo, na oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka.

Mentorica: prof. dr. Lea Demšar

Somentorica: doc. dr. Bojana Žegura

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Blaž Cigić
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Božidar Žlender
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Metka Filipič
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Doktorandka:

Ana Penko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 637.51/52+664.9:641.1:543.2/.9(043)=163.5
KG meso / piščančje meso / *n*-3 VNMK / rastlinski ekstrakti / heterociklični aromatski amini / oksidacija lipidov / oksidi holesterola / toplotna obdelava / citotoksičnost / genotoksičnost
AV PENKO, Ana, univ. dipl. inž. živil. tehnol.
SA DEMŠAR, Lea (mentorica)/ ŽEGURA Bojana (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, področje živilstva
LI 2015
IN VPLIV RASTLINSKIH EKSTRAKTOV NA ZMANJŠANJE VSEBNOSTI HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV IN OKSIDOV HOLESTEROLA V TOPLOTNO OBDELANEM PIŠČANČJEM MESU
TD Doktorska disertacija
OP XVI, 135 str., 39 pregl., 23 sl., 5 pril., 205 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen raziskave je bil proučiti vpliv dodatka rastlinskih ekstraktov v kompleksne matrikse (meso/sekljanine, običajne in obogatene z *n*-3 večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, VNMK) na zmanjšanje tvorbe zdravju škodljivih komponent, ki nastanejo med skladiščenjem svežega mesa v različnih aerobnih pogojih (produkti oksidacije lipidov; malondialdehid, TBK, in oksidi holesterola, OH) in med različnimi postopki toplotne obdelave ter stopnjami pečenosti mesa (heterociklični aromatski amini, HAA). Učinek dodanih rastlinskih ekstraktov se lahko zmanjša, če niso vezani na ustrezen nosilec. V izbranih rastlinskih ekstraktih smo določili vsebnost skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu, posamezne fenolne spojine z LC-MS, citotoksičnost in genotoksičnost le-teh pa preverili s testi MTT, MTS in komet. Vsebnost HAA in OH smo določili z LC-MS oz. LC-MS/MS, TBK spektrofotometrično. Fenolni profili izbranih etanolnih rastlinskih ekstraktov se razlikujejo, noben ne kaže citotoksičnosti oz. genotoksičnosti na testnih celicah HepG2. *n*-3-obogatitev povzroči povečanje števila TBK in vsebnosti OH ter praviloma zmanjša ($p > 0,05$) tvorbo HAA po toplotni obdelavi v primerjavi z običajnim mesom. Z vidika zaviranja oksidacijskih procesov smo ugotovili, da je kot nosilec ekstrakta najbolj primeren škrob, pakiranje v atmosfero z majhnimi koncentracijami O₂, ter med postopki toplotne obdelave pečenje na žaru. Dodatek ekstrakta brinovih jagod značilno zmanjša število TBK in OH, odvisno od uporabljenega nosilca ekstrakta (škrob < sol < olje). Tudi tvorbo HAA v mesu po toplotni obdelavi zmanjša dodatek večine rastlinskih ekstraktov, pri tem je zelo pomemben vpliv matriksa (integralni kos mesa vs. razdeto meso), načina toplotne obdelave (žar, pečica in pečica IR) ter nosilca ekstrakta. Značilno največ HAA in nasprotno najmanj malondialdehida (manjše število TBK) se tvori pri pečenju na žaru, pri pečenju v pečici in pečici IR pa približno enako. Skladiščenje piščančjega mesa in sekljancev v izrazito aerobnih pogojih (O₂, med 20 % in 80 %) poveča število TBK in vsebnost skupnih OH ter bistveno zmanjša vsebnost HAA po toplotni obdelavi v primerjavi s skladiščenjem pri majhni koncentraciji O₂ (< 0,1 %). Hkrati se v takih pogojih poslabšajo senzorični parametri, ki kažejo na oksidacijske procese (pojav žarke in postane arome).

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 637.51/52+664.9:641.1:543.2/.9(043)=163.5
- CX meat / chicken meat / *n*-3 PUFA / plant extracts / heterocyclic aromatic amines / lipid oxidation / cholesterol oxides / thermal treatment / cytotoxicity / genotoxicity
- AU PENKO, Ana
- AA DEMŠAR, Lea (supervisor)/ ŽEGURA Bojana (co-advisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, field Food Science and Technology
- PY 2015
- TI THE EFFECT OF PLANT EXTRACTS ON HETEROCYCLIC AROMATIC AMINES AND CHOLESTEROL OXIDES REDUCTION IN THERMALLY TREATED CHICKEN MEAT
- DT Dissertation thesis
- NO XVI, 135 p., 39 tab., 23 fig., 5 ann., 205 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The aim of this study was to examine the effect of the plant extracts addition in complex matrices (meat/patties, conventional or enriched with *n*-3 polyunsaturated fatty acids) to reduce the formation of harmful components that occur during storage of fresh meat in various aerobic conditions (products oxidation of lipids: thiobarbituric acid-reactive substances, TBARs, and cholesterol oxides, COPs) and different types of thermal treatment/doneness of meat (heterocyclic aromatic amines, HAA). The effect of plant extract addition may be reduced if they are not bounded to an appropriate carrier. The content of total phenolic compounds by the method of Folin-Ciocalteu method and individual phenolic compounds by LC-MS/MS of the selected plant extracts were determined, cytotoxicity and genotoxicity of them were checked by MTT, MTS and Comet test. The contents of individual and total HAA and OH were determined by LC-MS/MS and TBAR spectrophotometrically, respectively. Selected plant extracts discriminate according to their phenolic profile and that none of the ethanolic plant extracts does not show cytotoxicity or genotoxicity in tumor cells HepG2. *n*-3-enrichment has resulted in increased formation of TBARs and COPs, and decreased formation of HAA ($P > 0.05$) after heat treatment compared to conventionally produced meat. With regard to inhibition of oxidation processes, we found that the most suitable carrier for the extracts is starch, packing in an atmosphere with low concentrations of O₂ and grilling as thermal treatment. The addition of juniper berries extract significantly reduces TBARs and COPs contents, depending on the carrier of the extract (starch < salt < oil). Also the addition of the majority of plant extracts in the meat significant reduces on the HAA formation after the heat treatment, depending on matrix (an integral piece of meat *vs.* minced meat), type of heat treatment (grill, oven, and infrared oven), and carrier of the extract. Generally, the highest content of HAA and *vice versa* the lowest TBARs are formed during grilling, amounts formed during baking in the oven and IR oven are approximately the same. Storage chicken meat and patties in oxygen rich conditions (O₂, between 20% and 80%) increase the TBARs and content of total OH as well as significantly reduces content of HAA after heat treatment compared with storage at low O₂ concentration (< 0.1%). At the same time, in such conditions sensory parameters are deteriorated, that indicate on the oxidation processes in progress (occurrence of rancidity and warm-off flavours).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XII
KAZALO PRILOG	XIV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XV
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OKSIDATIVNI PROCESI V ŽIVILIH.....	3
2.1.1 Oksidacija lipidov	3
2.1.2 Oksidacija lipidov in senzorične lastnosti mesa	4
2.2 OKSIDI HOLESTEROLA (OH).....	7
2.2.1 Mehanizem nastanka oksidov holesterola	8
2.2.2 Oksidi holesterola v živilih.....	10
2.2.3 Dejavniki, ki vplivajo na nastanek oksidov holesterola v mesu	11
2.3 HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI (HAA).....	13
2.3.1 Vrste in strukture HAA.....	14
2.3.2 Tvorba HAA v mesu	15
2.3.2.1 Tvorba aminokarbolinov ali pirolitičnih HAA.....	15
2.3.2.2 Tvorba aminoimidazoazarenov (AIA) oz. »termičnih« HAA.....	16
2.3.3 Dejavniki, ki vplivajo na nastanek HAA v mesu	17
2.3.3.1 Vpliv karakteristik mesa	17
2.3.3.2 Vpliv pogojev toplotne obdelave	19
2.3.4 Mutagenost in karcinogenost HAA.....	20
2.4 RASTLINSKI EKSTRAKTI	23
2.4.1 Rastlinski ekstrakti v živilstvu	23
2.4.2 Rastlinski ekstrakti in preprečevanje oksidacije lipidov in holesterola	24
2.4.3 Rastlinski ekstrakti in preprečevanje tvorbe HAA	29
3 MATERIAL IN METODE DELA.....	31
3.1 MATERIAL ZA RAZISKAVO IN NAČRT DELA	33
3.1.1 Sklop I: Karakterizacija rastlinskih ekstraktov	33
3.1.1.1 Priprava rastlinskih ekstraktov	33
3.1.1.2 Celična linija HepG2	34
3.1.1.3 Gojenje in presajanje celic HepG2 <i>in vitro</i>	35
3.1.2 Sklop II: Vezava rastlinskih ekstraktov na različne nosilce in njihov vpliv na tvorbo HAA v piščančjih sekljancih, obogatenih z <i>n-3</i> VNMK.....	36
3.1.2.1 Material	36
3.1.2.2 Izvedba predposkusa	37

3.1.2.3	Vezava rastlinskih ekstraktov na nosilce	37
3.1.2.4	Priprava sekljancev	38
3.1.3	Sklop III: Marinade z ekstraktom brinovih jagod in njihov vpliv na tvorbo produktov oksidacije in HAA v piščančjih mini filejih, obogatenih z <i>n</i>-3 VNMK	39
3.1.3.1	Vezava ekstrakta brinovih jagod na olje	39
3.1.3.2	Priprava marinad	39
3.1.3.3	Mariniranje, pakiranje in toplotna obdelava mini filejev	39
3.1.4	Sklop IV: Različni aerobni pogoji v embalažni enoti in njihov vpliv na tvorbo produktov oksidacije in HAA v komercialnih piščančjih sekljancih, obogatenih z <i>n</i>-3 VNMK	41
3.1.4.1	Izdelava, pakiranje in skladiščenje sekljancev	41
3.2	METODE	44
3.2.1	Sklop I: Karakterizacija rastlinskih ekstraktov	44
3.2.1.1	Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu (FC)	44
3.2.1.2	Določanje koncentracije posameznih fenolnih spojin v ekstraktih	45
3.2.1.3	Določanje citotoksičnosti in genotoksičnosti etanolnih rastlinskih ekstraktov	47
3.2.2	Sklop II: Vezava rastlinskih ekstraktov na različne nosilce in njihov vpliv na tvorbo HAA v piščančjih sekljancih, obogatenih z <i>n</i>-3 VNMK.....	51
3.2.2.1	Določanje maščobnokislinske sestave	51
3.2.2.2	Določanje vsebnosti heterocikličnih aromatskih aminov (HAA)	51
3.2.2.3	Vrednotenje senzoričnih lastnosti piščančjih filejev obdelanih z različnimi postopki toplotne obdelave	53
3.2.2.4	Statistična obdelava podatkov za sklop II	54
3.2.3	Sklop III: Marinade z ekstraktom brinovih jagod in njihov vpliv na tvorbo produktov oksidacije in HAA v piščančjih mini filejih, obogatenih z <i>n</i>-3 VNMK	55
3.2.3.1	Instrumentalno merjenje barve.....	55
3.2.3.2	Število tiobarbiturne kisline (TBK).....	55
3.2.3.3	Določanje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola v mariniranih mini filejih	57
3.2.3.4	Vrednotenje senzoričnih lastnosti mariniranih piščančjih mini filejev	60
3.2.3.5	Določanje vsebnosti heterocikličnih aromatskih aminov (HAA)	60
3.2.3.6	Določanje vsebnosti kreatina in kreatinina	60
3.2.3.7	Statistična obdelava podatkov za sklop III.....	63
3.2.4	Sklop IV: Različni aerobni pogoji v embalažni enoti in njihov vpliv na tvorbo produktov oksidacije in HAA v komercialnih piščančjih sekljancih, obogatenih z <i>n</i>-3 VNMK	64
3.2.4.1	Določanje osnovne kemijske sestave in vrednosti pH	64
3.2.4.2	Sestava plinske mešanice v embalažni enoti	65
3.2.4.3	Statistična obdelava podatkov za sklop IV	66
4	REZULTATI.....	67
4.1	SKLOP I: KARAKTERIZACIJA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV	67
4.1.1	Določanje skupnih fenolnih spojin.....	67
4.1.2	Določanje posameznih fenolnih spojin	68
4.1.3	Določanje citotoksičnosti in genotoksičnosti etanolnih ekstraktov	68
4.1.3.1	Test MTS in MTT za določanje citotoksičnosti	68
4.1.3.2	Test komet za določanje genotoksičnosti rastlinskih ekstraktov	70

4.2	SKLOP II: VEZAVA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV NA RAZLIČNE NOSILCE IN NJIHOV VPLIV NA TVORBO HAA V PIŠČANČJIH SEKLJANCIH, OBOGATNIH Z <i>n-3</i> VNMK.....	73
4.2.1	Predposkus	73
4.2.2	Vpliv rastlinskih ekstraktov in nosilcev ekstraktov na tvorbo HAA v piščančjih sekljancih	77
4.3	SKLOP III: MARINADE Z EKSTRAKTOM BRINOVIH JAGOD IN NJIHOV VPLIV NA TVORBO PRODUKTOV OKSIDACIJE IN HAA V PIŠČANČJIH MINI FILEJIH, OBOGATENIH Z <i>n-3</i> VNMK	80
4.3.1	Instrumentalno merjenje barve površine	80
4.3.2	Število tiobarbiturne kisline (TBK)	81
4.3.3	Holesterol in oksidi holesterola	84
4.3.4	Heterociklični aromatski amini	88
4.3.5	Vrednotenje senzoričnih lastnosti	91
4.4	SKLOP IV: RAZLIČNI AEROBNI POGOJI V EMBALAŽNI ENOTI IN NJIHOV VPLIV NA TVORBO PRODUKTOV OKSIDACIJE IN HAA V KOMERCIALNIH PIŠČANČJIH SEKLJANCIH, OBOGATENIH Z <i>n-3</i> VNMK	93
4.4.1	Osnovna kemijska sestava sekljancev	93
4.4.1.1	Maščobnokislinska sestava	93
4.4.2	Koncentracija plinov v embalažnih enotah	95
4.4.3	Instrumentalno merjenje barve površine sekljancev	96
4.4.4	Število tiobarbiturne kisline (TBK)	97
4.4.5	Holesterol in oksidi holesterola	97
4.4.6	Heterociklični aromatski amini	99
4.4.7	Vrednotenje senzoričnih lastnosti	100
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	103
5.1	RAZPRAVA	103
5.1.1	Maščobnokislinska sestava	104
5.1.2	Oksidacijski produkti	104
5.1.3	Barva površine in senzorične lastnosti	108
5.1.4	Heterociklični aromatski amini	112
5.2	SKLEPI	115
6	POVZETEK	117
6.1	SUMMARY	119
7	VIRI	121

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Oksidi holesterola, ki so najpogosteje identificirani v živilih (Tai in sod., 1999; Baggio in sod., 2005)	10
Preglednica 2: Količina (v ppm) posameznih oksidov holesterola v različnih vrstah mesa glede na način obdelave in skladiščenja (povzeto po Tai in sod., 2000).....	13
Preglednica 3: Vsebnost posameznih HAA (ng/g) v toplotno obdelanem mesu in ribah (Pais in Knize, 2000)	18
Preglednica 4: Rastlinski material za pripravo ekstraktov in oznake ekstraktov	33
Preglednica 5: Deleži <i>n</i> -3 in <i>n</i> -6 VNMK ter razmerje <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 VNMK v običajni in z mletim lanenim semenom obogateni prehrani piščancev	36
Preglednica 6: Kromatografski pogoji (gradienti mobilne faze) pri določanju fenolnih spojin.....	46
Preglednica 7: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR načinu	46
Preglednica 8: Kromatografski pogoji (gradienti mobilne faze) pri določanju HAA.....	52
Preglednica 9: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR načinu	53
Preglednica 10: Volumni standardne raztopine in število TBK za pripravo umeritvene krivulje.....	56
Preglednica 11: Kromatografski pogoji (gradienti mobilne faze) pri določanju oksidov holesterola in holesterola	58
Preglednica 12: Pogoji detekcije pri določanju 7 α -HC, 7 β -HC, 20 α -HC, 22-HC, 25-HC in holesterola v MRM	59
Preglednica 13: Kromatografski pogoji (gradienti mobilne faze) pri določanju kreatina in kreatinina	61
Preglednica 14: Pogoji detekcije pri določanju vsebnosti kreatina in kreatinina	62
Preglednica 15: Redčitve osnovne raztopine (SS) kreatina/kreatinina za pripravo umeritvene krivulje.....	62
Preglednica 16: Rezultati določanja skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v rastlinskih ekstraktih brinovih jagod, lubja bora, rožmarina, jabolčnih oljčnih in grozdnih tropin ter grozdnih pešk, izraženih kot galna kislina v mg na liter ekstrakta.....	67
Preglednica 17: Maščobne kisline in njihova vsebnost v običajnih in <i>n</i> -3–obogatenih piščančjih filejih.....	74
Preglednica 18: Vpliv načina toplotne obdelave/dosežene središčne temperature in dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (<i>n</i> -3–obogatitev) na vsebnost (μ g/kg) nekaterih posameznih in skupnih HAA v skorji toplotno obdelanih piščančjih filejev	75
Preglednica 19: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR) in stopnje pečenosti ($T_s = 82$ in 95 °C) na izgubo mase (%) med toplotno	

obdelavo filejev piščancev, krmljenih s krmo z dodatkom lanenega semena (<i>n</i> -3 obogatitev) in brez dodatka (običajno)	76
Preglednica 20: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in IR-pečici) in stopnje pečenosti ($T_s = 82$ in 95 °C) na senzorične lastnosti toplotno obdelanih filejev piščancev, krmljenih z dodatkom mletega lanenega semena (<i>n</i> -3) in brez dodatka (običajno)	77
Preglednica 21: Vpliv dodatka različnih rastlinskih ekstraktov in nosilcev (sol, škrob) teh ekstraktov na vsebnost ($\mu\text{g}/\text{kg}$) nekaterih posameznih in skupnih HAA v pečenih sekljancih iz mesa piščancev, krmljenih z dodatkom mletega lanenega semena (<i>n</i> -3) in brez dodatka (običajno)	78
Preglednica 22: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (<i>n</i> -3-obogatitve) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C na parameter oksidacije lipidov (število TBK) presnih mariniranih piščančjih mini filejev, pakiranih v modificirano atmosfero.....	81
Preglednica 23: Vpliv različnih nosilcev (kontrola, oje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na parameter oksidacije lipidov (TBK) presnih mariniranih mini filejev piščancev, krmljenih z dodatkom mletega lanenega semena (<i>n</i> -3-obogatitev) in brez dodatka (običajno), pakiranih v modificirani atmosferi, med devetdnevni skladiščenjem in pri temperaturi (4 ± 1) °C.....	82
Preglednica 24: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (<i>n</i> -3-obogatitev) in različnih nosilcev (kontrola, olje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na oksidacijo lipidov (TBK) v vakuumsko pakiranih mariniranih presnih in na dvoploščnem žaru (temperatura plošč 220 °C, 5 min) toplotno obdelanih mini filejih po devetih dneh skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C.....	83
Preglednica 25: Vpliv načina pakiranja (modificirano in vakuumsko) na oksidacijo lipidov (TBK) v presnih in na dvoploščnem žaru pečenih (temperatura plošč 220 °C, 5 min) mariniranih običajnih in <i>n</i> -3-obogatenih mini filejev po devetdnevni skladiščenju pri temperaturi (4 ± 1) °C	84
Preglednica 26: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (<i>n</i> -3-obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C na vsebnost skupnih oksidov holesterola (OH) in holesterola (mg/kg) ter obseg oksidacije (%) v presnih mariniranih piščančjih mini filejih pakiranih v modificirano atmosfero.....	85
Preglednica 27: Vpliv različnih nosilcev (kontrola, olje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na vsebnost skupnih oksidov holesterola (OH) in holesterola (mg/kg) ter obseg oksidacije (%) v presnih običajnih in <i>n</i> -3-obogatenih mariniranih piščančjih mini filejih, pakiranih v modificirani atmosferi, med devetdnevni skladiščenjem pri temperaturi (4 ± 1) °C	86
Preglednica 28: Vpliv načina pakiranja (modificirano in vakuumsko) na vsebnost skupnih oksidov holesterola (OH) in holesterola (mg/kg) ter obseg oksidacije (%) v presnih običajnih in <i>n</i> -3-obogatenih mariniranih piščančjih mini filejih, po devetdnevni skladiščenju pri temperaturi (4 ± 1) °C	87
Preglednica 29: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (<i>n</i> -3-obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C na vsebnost skupnih	

HAA (ng/kg) v mariniranih piščančjih mini filejih, toplotno obdelanih s tremi različnimi postopki (pečica IR, pečica, žar)	88
Preglednica 30: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR) in nosilca (kontrola, olje, škrob in sol) ekstrakta brinovih jagod na vsebnost nekaterih posameznih in skupnih HAA (ng/kg) v obdelanih mini filejih piščancev, krmljenih z dodatkom mletega lanenega semena (<i>n</i> -3–obogatitev) in brez dodatka (običajno), po devetdnevem skladiščenju v modificirani atmosferi in pri temperaturi (4 ±1) °C.....	89
Preglednica 31: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR) in nosilca (kontrola, olje, škrob in sol) ekstrakta brinovih jagod na senzorične lastnosti toplotno obdelanih mariniranih običajnih in <i>n</i> -3–obogatenih mini filejev, pakiranih v modificirani atmosferi, med devetdnevem skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C.....	92
Preglednica 32: Osnovni statistični parametri osnovne kemijske sestave običajnih in <i>n</i> -3–obogatenih piščančjih sekljancev	93
Preglednica 33: Maščobne kisline in njihova vsebnost (g/100 g SMK) v običajnih in <i>n</i> -3–obogatenih piščančjih sekljancih.....	93
Preglednica 34: Sestava plinske mešanice v embalažnih enotah piščančjih sekljancev na dan pakiranja in po osem dnevnem skladiščenju pri temperaturi (4 ±1) °C.....	95
Preglednica 35: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (<i>n</i> -3–obogatitev) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osem dnevnem skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C na instrumentalno izmerjeno barvo površine presnih sekljancev.....	96
Preglednica 36: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (<i>n</i> -3–obogatitev) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osem dnevnem skladiščenjem pri temperaturi (4±1) °C na oksidacijo lipidov (TBK, mg malondialdehida/kg) na presnih sekljancih	97
Preglednica 37: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (<i>n</i> -3–obogatitev) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osem dnevnem skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C na vsebnost holesterola in skupnih oksidov holesterola (OH, mg/kg) ter stopnje oksidacije (%) po pečenju na dvoploščnem žaru	99
Preglednica 38: Vpliva dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (<i>n</i> -3–obogatitev) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osem dnevnem skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C na vsebnost prekurzorjev HAA (mMol/ kg) presnih sekljancev ter vsebnost skupnih HAA (µg/kg) po pečenju sekljancev na dvoploščnem žaru	100
Preglednica 39: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (<i>n</i> -3–obogatitev) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osem dnevnem skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C na senzorične lastnosti sekljancev po pečenju na dvoploščnem žaru.....	101

KAZALO SLIK

Slika 1: Začetne stopnje avtooksidacije holesterola (Lercker in Rodriguez-Estrada, 2002).....	9
Slika 2: Strukturne formule glavnih aminokobolinov in aminoimidazoazarenov (Turesky, 2010; Alaejos in Afonso, 2011).	14
Slika 3: Tvorba imidazokinolinov (IQ) in imidazokinoksalinov (IQx) (Felton in sod., 2000).....	16
Slika 4: Shematski prikaz celotnega eksperimenta po posameznih sklopih.....	32
Slika 5: Shematski prikaz prvega sklopa – priprava rastlinskih ekstraktov in njihova karakterizacija.....	34
Slika 6: Shematski prikaz predposkusa	37
Slika 7: Shematski prikaz poteka osrednjega poskusa sklopa II.....	38
Slika 8: Shematski prikaz poteka eksperimenta sklopa III.....	40
Slika 9: Shema postopka izdelave piščančjih sekljancev, obdelave in vzorčenja	42
Slika 10: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin	45
Slika 11: Umeritvena krivulja za določanje števila TBK v mariniranih mini filejih.....	57
Slika 12: Umeritvena krivulja za določanje kreatina v mariniranih mini filejih.....	63
Slika 13: Umeritvena krivulja za določanje kreatinina v mariniranih mini filejih.....	63
Slika 14: Določanje živosti celic HepG2 (%) s testom MTS (glede na topilo) po 24 urnem tretiranju z rastlinskimi ekstrakti	69
Slika 15: Določanje živosti celic HepG2 (%) s testom MTT (glede na topilo) po 24 urnem tretiranju z rastlinskimi ekstrakti	69
Slika 16: Nastanek poškodb DNK (% DNK v repu) pri celicah HepG2 po 24-urni izpostavitvi 1 v/v % raztopini ekstraktov brinovih jagod (BR1, BR3 in BR4).....	70
Slika 17: Nastanek poškodb DNK (% DNK v repu) pri celicah HepG2 po 24-urni izpostavitvi 1 v/v % raztopini ekstraktov lubja bora (LB3, LB4, LB5 in LB6).....	71
Slika 18: Nastanek poškodb DNK (% DNK v repu) pri celicah HepG2 po 24-urni izpostavitvi 1 v/v % raztopini ekstraktov rožmarina (ROŽ2, ROŽ3 in ROŽ4)	71
Slika 19: Nastanek poškodb DNK (% DNK v repu) pri celicah HepG2 po 24-urni izpostavitvi 1 v/v % raztopini ekstraktov jabolčnih tropin (JT1, JT2 in JT3).....	72
Slika 20: Nastanek poškodb DNK (% DNK v repu) pri celicah HepG2 po 24-urni izpostavitvi 1 v/v % raztopini ekstraktov grozdnih pešk (GP1) in tropin (GT1) ter oljčnih tropin (OT1 in OT2)	72
Slika 21: Razlike v spremembi svetlosti (ΔL^*) in nasičenosti barve (ΔC^*) presnih piščančjih sekljancev, <i>n</i> -3 obogatenih in običajnih, hranjenih pri različnih atmosferah v embalažnih enotah 8 dni pri temperaturi (4 ±1) °C; kont, meso piščancev krmljenih brez dodanega lanenega semena; <i>n</i> -3, meso piščancev, krmljenih z dodanim mletim lanenim semenom; WF-ICO ₂ , zavijanje v za zrak	

prepustno folijo, 21 % O ₂ , < 1 % CO ₂ , 78 % N ₂ ; MAP-hCO ₂ , 20 % O ₂ , 30 % CO ₂ , 50 % N ₂ ; MAP-hO ₂ , 80 % O ₂ , 20 % CO ₂ ; MAP-IO ₂ , < 1 % O ₂ , 25 % CO ₂ , 74 % N ₂	109
Slika 22: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (<i>n</i> -3-obogatitev) na vsebnost oksidov holesterola (OH), heterocikličnih aromatskih aminov (HAA) in TBK piščančjih sekljancev, skladiščenih 8 dni pri temperaturi (4 ±1) °C, glede na atmosfero v embalažni h enotah (MAP-IO ₂ – <1% O ₂ , MAP-hCO ₂ – 20% O ₂ , WF-ICO ₂ – 21% O ₂ in MAP-hO ₂ – 87% O ₂).....	113
Slika 23: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (<i>n</i> -3-obogatitev) in vrste nosilca ekstrakta brinovih jagod na vsebnost oksidov holesterola (OH), heterocikličnih aromatskih aminov (HAA) in TBK mariniranih piščančjih mini filejev, skladiščenih 9 dni pri temperaturi (4 ±1) °C in pečenih na dvoploščnem žaru (T _s = 82 °C)	114

KAZALO PRILOG

Priloga A: Sklop I: Karakterizacija rastlinskih ekstraktov

Priloga B: Sklop II: Vezava rastlinskih ekstraktov na različne nosilce in njihov vpliv na tvorbo HAA v piščančjih sekljancih, obogatenih z *n*-3 VNMK

Priloga C: Sklop III: Marinade z ekstraktom brinovih jagod in njihov vpliv na tvorbo produktov oksidacije in HAA v piščančjih mini filejih, obogatenih z *n*-3 VNMK

Priloga D: Sklop IV: Različni aerobni pogoji v embalažni enoti in njihov vpliv na tvorbo produktov oksidacije in HAA v komercialnih piščančjih sekljancih, obogatenih z *n*-3 VNMK

Priloga E: Sestava medija in ostalih raztopin za gojenje celic HepG2 in raztopin pri testu komet

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

20 α -HC	20 α -hidroksiholesterol
25-HC	25-hidroksiholesterol
4,8-DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetil-3H-imidazo[4,5-f]kinoksalin
4-CH ₂ OH-MeIQx	4-hidroksimetil-2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f] kinoksalin
4'-hydroxy-PhIP	2-amino-6-(4-hidroksifenil)-1-metilimidazo[4,5-b] piridin
5 α -HC	5 α -hidroksiholesterol
5 α -HPC	5 α -hidroksiperoksiholesterol
5,6 α -EC	5,6 α -epoksiholesterol
5,6 β -EC	5,6 β -epoksiholesterol
7,8- DiMeIQx	2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
7-HPC	7-hidroperoksiholesterol
7-KC	7-ketoholesterol
7 α -HC	7 α -hidroksiholesterol
7 β -HC	7 β -hidroksiholesterol
8-CH ₂ OH-IQx	2-amino-(8-hidroksimetil)-3-metilimidazo[4,5-f]kinoksalin
AcN	acetonitril
AIA	aminoimidazoazareni
AK	aminokislina
ALS	prelomi DNK zaradi labilnih mest (iz angl.: alkali labile sites)
ATP	adenozintrifosfat
A α C	2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol
BaP	benzo(a)piren
BHA	3-terciarni butil-4-hidroksi anizol
BHT	6-diterciarni butil-p-hidroksi toluen
BMV	bledo, mehko, vodeno
BR1	brinove jagode (Volče, 550 m n.m.v.)
BR2	brinove jagode (Vremščica, 1000 m n.m.v.)
BR3	brinove jagode (kupljen)
BR4	brinove jagode (Vremščica, 1000 m n.m.v.; sveže nabrane)
CT	holestantriol
DHA	dokozaheksaenojska kislina
DMIP	2-amino-1,5-dimetilimidazo[4,5-b]piridin
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DPA	dokozapentaenojska kislina
DSB	prelom obeh verig DNK (iz angl. double strands breaks)
EDTA	etilendinitrilotetraocetna kislina
ENMK	enkrat nenasičene maščobne kisline
FBS	serum govejega zarodka (iz ang. fetal bovine serum)
FC	Folin-Ciocalteus phenol reagent
GC	plinska kromatografija
GC-FID	plinski kromatograf s plamensko ionizacijskim detektorjem
Glu-P-1	2-amino-6- metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Glu-P-2	2-aminodipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
GPI	grozdne peške sorte Refošk

GT1	grozdne tropine sorte Refošk
HAA	heterociklični aromatski amini
HepG2	celice humanega hepatoma
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPLC-MS	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z masnim spektrometrom
IFP	2-amino-1,6-dimetilfuro[3,2-e]imidazo[4,5-b]piridin
IARC	Mednarodna agencija za raziskavo raka (iz angl.: International Agency for Research on Cancer)
IQ	2-amino-3-metil-3H-imidazo[4,5-f]kinolin
IQ _x	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinoksalin
JT1	jabolčne tropine sorte Idared
JT2	jabolčne tropine sorte Gloster
JT3	jabolčne tropine sorte Mutsu
LB1	lubje črnega bora (območje Kopra)
LB2	lubje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.m.v.)
LB3	lubje črnega bora (Volče, 550 m n.m.v.)
LB4	lubje rdečega bora
LB5	lubje zelenega bora
LB6	lubje pinje (območje Kopra)
LC-MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masnim spektrometrom
LMP agaroz	agaroz z nizko temperaturo taljenja (iz angl. low melting point agarose)
MAP	pakiranje v modificirano atmosfero (iz angl. modified atmosphere packing)
MeAαC	2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol
MeIQ	2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin
MeIQ _x	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
MeOH	metanol
MRM	iz angl. Multiple Reaction Monitoring
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolim
MTT	(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NMK	nasičene maščobne kislin
NMP agaroz	agaroz z normalno temperaturo taljenja (iz angl. normal melting point agarose)
O ₂ ⁻	superoksidni radikal
OH	oksid holesterola
OH ⁻	hidroksidni radikal
OT1	oljne tropine sorte Belica
OT2	oljne tropine sorte Črnica
PBS	fiziološka raztopina v fosfatnem pufri (iz ang. phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (iz ang. polymerase chain reaction)
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin
PMS	fenazil metasulfat
<i>ppb</i>	part per bilion
<i>ppm</i>	part per milion

RNK	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
ROŽ1	svež rožmarin (domač)
ROŽ2	suh rožmarin (Kotanyi)
ROŽ3	suh rožmarin (Maestro)
ROŽ4	suh rožmarin (območje Kopra)
SIR	iz angl. Single Ion Recording
SPE	ekstrakcija s trdno fazo (iz angl. solid phase extraction)
SSB	prelom ene verige DNK (iz angl. single strands breaks)
TBK	število tiobarbiturne kisline
TRC	Toronto Research Chemical
TriMeIQx	2-amino-3,4,7,8-tetrametil-3H-imidazo[4,5-f]kinoksalin
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol
Trp-P-2	3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol
Ts	središčna temperatura
Tž	temperatura plošč žara
VNMK	večkrat nenasičene maščobne kisline
WOF	aroma po pogretem oz. postanem (iz angl. Warmed over flavour)

1 UVOD

V živilski industriji gre trend v smeri razvoja t.i. funkcionalnih živil, ki naj bi imela pozitivne učinke na zdravje ljudi, in pri tem mesna industrija ni izjema. Na trgu je precej razširjeno meso s povečano vsebnostjo *n-3* večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK), kar lahko dosežemo preko krme živali. Znano je namreč, da uživanje živil z večjim deležem *n-3* VNMK zmanjšuje tveganje za razvoj srčno-žilnih bolezni ter celo zavira rast tumorjev (Azcona in sod., 2008).

Zavedati se je treba, da ima povečan delež *n-3* VNMK v mesu lahko tudi negativne posledice, saj zaradi slabše oksidativne stabilnosti vodi v obsežno oksidacijo lipidov in nastanek drugih produktov oksidacije, kot so npr. oksidi holesterola, ki v človeškem organizmu dokazano delujejo citotoksično, mutageno, karcinogeno in aterogeno (Souza in Silva, 2006; Hur in sod., 2007). Hkrati pa oksidacijski procesi vodijo tudi v poslabšanje senzorične kakovosti.

Nekatere raziskave so celo pokazale povezavo med oksidacijo lipidov in tvorbo mutagenih in karcinogenih heterocikličnih aromatskih aminov (HAA). Lipidi in njihovi produkti oksidacije se namreč na različne načine lahko vključujejo v Maillardovo reakcijo (Farmer in Mottram, 1990) in na tak način z interakcijami vplivajo na tvorbo HAA v mesu (Faulkner, 1994; Johansson, 1995). Pri tem gre bodisi za interakcijo lipidov ali produktov lipidne oksidacije/razgradnje z Maillardovo reakcijo ali reakcijo z nekaterimi produkti Maillardove reakcije, pri čemer se tvorijo piridin oz. pirazin vsebujoči intermediati (Johansson, 1995). Znano je, da lipidi vplivajo na povečano tvorbo pirazinov in piridinov (Gray in sod., 1996).

HAA so komponente, ki se tvorijo med suhimi postopki (pečenje, praženje in cvrenje) toplotne obdelave visokobeljakovinskih živil. (Felton in sod., 1997; Persson in sod., 2003; Messner in Murkovic, 2004). HAA v mesu nastajajo v procesu kompleksnih reakcij, ki med toplotno obdelavo pri visoki temperaturi potečejo med prostimi aminokislinami (AK), kreatinom/kreatininom in ogljikovimi hidrati, t.j. sestavinami, ki so naravno prisotne v mesu (Zöchling in Murkovic, 2002).

HAA so dokazano spojine z visokim mutagenim in karcinogenim potencialom, zato lahko poškodujejo DNK in povzročijo nastanek raka na različnih organih (Persson in sod., 2003; Oz in sod., 2010; Quelhas in sod., 2010).

Z namenom omejitve oksidativnih procesov in zmanjšanja tvorbe HAA potekajo številne raziskave o možnosti uporabe različnih naravnih rastlinskih ekstraktov. Ti so bogat vir fenolnih spojin, za katere predpostavljajo, da zaustavljajo avtooksidacijo maščob v živilu, tako da se fenolna spojina (AH) vključi v fazo iniciacije ali propagacije, pri čemer AH reagira s peroksilnim radikalom (LOO[•]), ki nastane z oksidacijo maščobe, in je ključen za tvorbo oksidov holesterola (Aytul, 2010). Glede na to, da v procesu tvorbe HAA kot vmesni produkti nastajajo prosti piridinski oz. pirazinski radikali, lahko hipotetično sklepamo, da dodatek snovi z visokim antioksidativnim potencialom ugodno vpliva na zmanjšano tvorbo HAA v mesu, s tem ko vežejo nastale proste radikale (Kikugawa, 1999; Vitaglione in Fogliano, 2004). V večini primerov je predhodno mariniranje mesa, npr. v marinadi zelenega čaja (Quelhas in sod., 2010); oz. dodatek ekstrakta grozdnih pešk, jabolk,

rožmarina, timijana (Cheng in sod., 2007; Gibis in Weiss, 2012) zmanjšalo količino nastalih HAA v primerjavi s kontrolo, kar je bil tudi osnovni namen te naloge.

1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen raziskovalnega dela je bilo vrednotenje vpliva dodatka biološko aktivnih učinkovin naravnih rastlinskih ekstraktov v kompleksne matrikse, kot je meso oz. sekljanine, na zmanjšanje tvorbe zdravju škodljivih komponent, ki nastanejo med skladiščenjem svežega mesa (produkti oksidacije lipidov) in med različnimi postopki toplotne obdelave mesa (HAA). Nekatere aktivne učinkovine naravnih rastlinskih ekstraktov so znane po antimikrobnih in antioksidativnih lastnostih ter potencialnem antikarcinogenem delovanju. Pri tem smo se osredotočili tudi na vpliv obogatitve piščančjega mesa z *n*-3 VNMK.

Naše raziskovalno delo je temeljilo na naslednjih hipotezah:

- Hipoteza (1): pričakujemo različno sestavo biološko aktivnih učinkovin naravnih rastlinskih ekstraktov.
- Hipoteza (2): izbrani naravni rastlinski ekstrakti ne bodo povzročali citotoksičnih in genotoksičnih sprememb na celicah modela humanega hepatoma HepG2.
- Hipoteza (3): pričakujemo, da bo *n*-3-obogatitev piščančjega mesa povzročila povečano tvorbo produktov oksidacije in HAA v primerjavi z običajnim mesom.
- Hipoteza (4): pričakujemo, da bodo različni nosilci in na njih vezani rastlinski ekstrakti v različnem obsegu zmanjševali tvorbo produktov oksidacije in HAA, odvisno od uporabljenega matriksa (meso ali sekljanci).
- Hipoteza (5): pričakujemo, da je tvorba produktov oksidacije in HAA pogojena z uporabljenim načinom toplotne obdelave in stopnjo pečenosti mesa.
- Hipoteza (6): pričakujemo, da bo skladiščenje v aerobnih pogojih zelo poslabšalo določene parametre kakovosti piščančjih sekljancev, kot so barva, aroma, vsebnost malondialdehida, oksidov holesterola (OH) in HAA.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDATIVNI PROCESI V ŽIVILIH

2.1.1 Oksidacija lipidov

Oksidacija lipidov je eden glavnih dejavnikov, ki zmanjšuje kvaliteto in senzorično sprejemljivost mesa in mesnih izdelkov med procesi predelave, skladiščenjem in distribucijo. Oksidacija lipidov namreč vodi v pojav diskoloracij, priokusov, neprijetnega vonja in arome ter poslabšanja teksture (Gray in sod., 1996; Morissey in sod., 1998; Chaijan, 2008).

Oksidacija lipidov povzroči tudi poslabšanje prehranske vrednosti živila, saj se pri tem izgubljajo v lipidih topni vitamini ter esencialne maščobne kisline. Ob tem se tvorijo tudi za človeka potencialno toksični, mutageni in celo kancerogeni produkti (hidroperoksidi, aldehidi, oksidi holesterola, *trans* maščobne kisline) (Jiemenez-Colmenero in sod., 2001; Selani in sod., 2011). Aldehidi, ki nastanejo med oksidacijo lipidov, so sposobni vezave na proteine, s katerimi tvorijo adukte in tako poslabšajo stabilnost in funkcionalnost proteinov (Min in Ahn, 2005).

Oksidacija lipidov *in vivo* v živalih in nato v mesu se najpogosteje začne na VNМК fosfolipidov celičnih membran (Jayathilakan in sod., 2005). Tu se nahajajo tudi druge nenasičene, v maščobah topne, molekule (npr. holesterol), ki so prav tako nagnjene k oksidaciji.

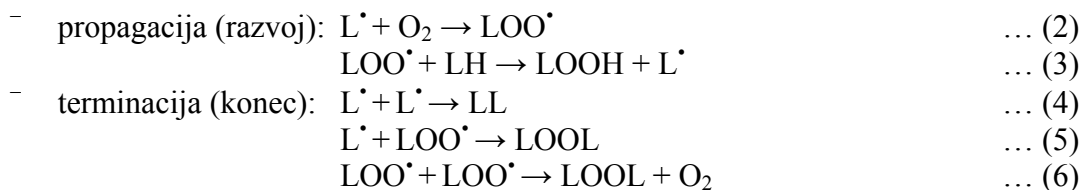
Poznana sta dva osnovna mehanizma (načina) oksidacije lipidov, in sicer encimska ter neencimska oksidacija oz. t.i. avtooksidacija.

Encimska oksidacija lipidov poteka v prisotnosti encima mišične celice, lipooksigenaze, ki katalizira oksidacijo prostih maščobnih kislin do hidroperoksidov. Ta reakcija poteče le v prisotnosti prostih maščobnih kislin, ki nastanejo s prehodno lipolizo (Jayathilakan in sod., 2005). Encimska oksidacija je v glavnem odgovorna za oksidacijo maščob v zamrznjenem mesu in toplotno obdelanih proizvodih, saj ta encim prenese nizke temperature, aktiven pa ostane tudi po toplotni obdelavi.

Za meso in mesne izdelke je bolj značilna avtooksidacija. To je spontana neencimska oksidacija lipidov, ki pod vplivom t.i. iniciatorjev oksidacije vstopijo v serijo verižnih reakcij prostih radikalov. Pomembno vlogo pri poteku te kompleksne verižne reakcije ima kisik oz. njegove visoko reaktivne oblike, t.i. reaktivne kisikove zvrsti (ROS), kot so hidroksilni radikal, superoksidni anion, vodikov peroksid, hidroperoksilni radikal, singletni kisik..., ki zaradi svoje visoke reaktivnosti pogosto sprožajo oksidacijo lipidov (Min in Ahn, 2005). Kot iniciatorji te reakcije pogosto delujejo tudi kovinski ioni, toplota, svetloba, sevanje, kemikalije (Aytul, 2010).

Reakcija avtooksidacije poteče v treh fazah (Min in Ahn, 2005; Erickson, 2008):

- iniciacija (začetek):
$$\text{LH} + \text{iniciator} \rightarrow \text{L}^{\bullet} + \text{iniciatorH} \text{ (reducirana oblika iniciatorja)} \quad \dots (1)$$



Proces avtooksidacije sproži iniciator, ki deluje na nenasičene maščobne kisline in v fazi iniciacije povzroči odcepitev šibko vezanega vodikovega atoma iz metilne skupine lipidne molekule (LH). Rezultat tega je nastanek visoko reaktivnega lipidnega radikala (L^{\bullet}). V prvem koraku faze propagacije nestabilen lipidni radikal hitro reagira s kisikom in pri tem nastane peroksilni radikal (LOO^{\bullet}), ki nato nadaljuje fazo propagacije. Peroksilni radikal ima sposobnost odcepljanja vodikovih atomov iz sosednjih maščobnih kislin in s tem sproži verižno reakcijo. Pri tem nastajajo novi lipidni prosti radikali in lipidni hidroperoksid. Takšna vrsta interakcije lahko poteče desetkrat pa vse do stokrat, preden dva prosta radikala v fazi terminacije zaključita proces in tvorita nevtralne produkte (LOOL) (Erickson, 2008).

Lipidni hidroperoksidi so glavni primarni produkti oksidacije lipidov. So nehlapni, brez vonja in okusa in kot taki ne vplivajo na poslabšanje kakovosti živil. Hidroperoksidi so relativno neobstoje spojine, ki se v fazi sekundarne oksidacije hitro razgradijo do številnih stabilnih sekundarnih produktov. To so hlapne in nehlapne komponente, kot so karbonili (aldehidi, ketoni), alkoholi, hidrokarboni (alkani, alkeni) in furani, ki povzročajo poslabšanje arome in nadaljnje reakcije, ki vodijo do poslabšanja kakovosti (Zelenik-Blatnik, 1992; Žlender, 2000; Erickson, 2008).

Proces oksidacije lipidov pospeši velika koncentracija kisika. Nasprotno pa velja, da lipidni radikal deluje tudi v pogojih z majhno koncentracijo kisika, ko lahko reagira s katerokoli komponento membrane, kot so npr. protein ali holesterol, kar lahko sproži oksidacijo holesterola (Min in Ahn, 2005).

2.1.2 Oksidacija lipidov in senzorične lastnosti mesa

Oksidacija lipidov je eden od primarnih mehanizmov poslabšanja kakovosti mesa in še posebej mesnih izdelkov. Spremembe kakovosti se manifestirajo v nezaželenih spremembah arome, barve, teksture, prehranske vrednosti, in v potencialno nevarnem pojavu toksičnih substanc.

Razvoj oksidiranih tujih arom – žarkosti je že dolgo poznan kot resen problem med shranjevanjem in distribucijo mesa in mesnin. Žarkost v mesu se prične razvijati takoj po smrti živali in se nadaljuje ter intenzivira do stopnje, ko meso ali izdelek postaneta nesprejemljiva za uživanje.

Proces oksidacije lipidov in z njim povezane oksidativne spremembe se začnejo takoj po zakolu in se nadaljujejo v posmrtni fazi, ko potekajo biokemijski procesi pretvorbe mišice v meso. Takrat pride do porušanja ravnotežja med prooksidanti (železo, baker) in antioksidativnim zaščitnim mehanizmom v prid prooksidantov, ki sprožijo oksidacijo VNМК v fosfolipidnem dvosloju. Na oksidativne procese v posmrtni fazi vpliva tudi hiter padec vrednosti pH, temperatura trupov in elektrostimulacija, ki povzročijo sproščanje kovinskih ionov, ki delujejo kot prooksidanti (Morissey in sod., 1998).

Vsi nadaljnji procesi obdelave, kot so mletje, razdevanje, sekljanje, zmrzovanje, tajanje in toplotna obdelava povzročijo poškodbe oz. porušenje celovitosti mišičnih membran, kar privede do bistvene spremembe celične ureditve. To olajša interakcije prooksidantov z VNMK membranskih fosfolipidov, kar se odraža v pospešenem generiranju prostih radikalov in s tem pospešeni oksidaciji lipidov (Morrisey in sod., 1998).

Znano je, da je sveže meso v kosu veliko manj dovzetno za oksidacijo kot razdeto meso. Pri razdevanju, še posebej pa pri mletju, pride do porušanja celičnih struktur ter povečanja površine, ki reagira s kisikom (Honikel, 2009; Faustman in sod., 2010).

Potek in obseg oksidacije lipidov je v veliki meri odvisen tudi od vrste živali (mesa) in tipa mišice, pri čemer sta ključna dejavnika predvsem delež VNMK in hemovega pigmenta, ki je vir železovih ionov. Min in sodelavci (2008) so v svoji raziskavi zajeli tri različne vrste mesa (govedina, svinjina in piščančje meso) in spremljali potek oksidacije lipidov med skladiščenjem. Med skladiščenjem surovega mesa se je število tiobarbiturne kisline (TBK), ki je glavni pokazatelj oksidacije lipidov, najbolj povečala pri govedini, bistveno manj pa pri svinjini in piščančjem mesu. Nasprotno pa se je pokazalo pri toplotno obdelanem mesu, saj je bilo v tem primeru piščančje meso bistveno najbolj dovzetno za lipidno oksidacijo. S tem so pokazali, da je za potek oksidacije lipidov različnih vrst surovega mesa med skladiščenjem odgovoren hemov pigment, medtem ko je pri toplotno obdelanem mesu ključen predvsem delež VNMK.

Predpostavlja se, da se glavna VNMK nahaja v obliki trigliceridov. Ti se nalagajo v maščobnem tkivu, kjer je količina in dostopnost prooksidantov, kot je npr. mioglobin, zelo nizka. Posledično je stopnja oksidacije v surovem mesu glede na vsebnost VNMK zelo nizka. Značilno je, da je delež VNMK v obliki trigliceridov v piščančjem stegnu bistveno večji kot v svinjski in goveji pečenki, kar je ključno pri oksidaciji lipidov v toplotno obdelanem mesu. Med toplotno obdelavo namreč pride do porušitve strukture celične membrane, s čimer se za prooksidante poveča dostopnost VNMK v trigliceridih in posledično je proces oksidacije lipidov najbolj izrazit prav pri piščančjih stegnih, kjer število (TBK) najhitreje naraste (Min in sod., 2008).

To potrjuje tudi raziskava, ki jo je opravil Rhee s sodelavci (1996), kjer je bilo število TBK v kuhanem piščančjem stegnu kar dvakrat večje kot v govedini, svinjini in piščančjih prsih (Min in sod., 2008).

Pomembno vlogo pri poteku oksidacije lipidov v posameznih vrstah mesa ima tudi delež železa, ki deluje kot močan prooksidant. Med vsemi vrstami mesa vsebuje govedina pričakovano največ skupnega in hemovega železa. Glavni vir hemovega železa v govedini predstavlja mioglobin. Mioglobin je pomembna spojina v procesu oksidacije lipidov v mesu, saj se v prisotnosti vodikovega peroksida (H_2O_2) ali LOOH lahko pretvori do ferilmoglobina. Ta je glavni vir hematina in prostih železovih ionov, ki sprožijo iniciacijo in katalizirajo propropagacijo oksidacije lipidov (Min in Ahn, 2005). Glede na višjo vsebnost mioglobina v govedini v primerjavi z drugimi vrstami mesa, se med skladiščenjem tvori več ferilmoglobina in/ali hematina, ki sta primarno odgovorna za višje število TBK v surovi govedini. Prav tako je mioglobin odgovoren za večjo stopnjo oksidacije lipidov v toplotno

obdelani govedini, saj je pri tem mioglobin glavni vir nehemovega železa, katerega delež med skladiščenjem najbolj naraste med vsemi vrstami mesa (Min in sod., 2008).

Tudi Kim in sodelavci (2002) poročajo, da govedina kaže večjo dovzetnost za lipidno oksidacijo kot svinjina in puranja prsna mišica.

Številni avtorji navajajo, da sta mehanizma oksidacije lipidov in oksidacije mioglobina v mesu med seboj tesno povezana in pogojujeta eden drugega. Značilno je, da oksidacija lipidov zvišuje raven tvorbe metmioglobina in obratno metmioglobin deluje kot katalizator oksidacije lipidov. Z naraščajočo stopnjo oksidacije lipidov se poslabšuje aroma in tudi barva mesa.

Superoksidni radikal (O_2^-) in H_2O_2 , ki nastajata kot produkta oksidacije oksimioglobina, lahko naprej reagirata z železom. Pri tem nastane hidroksilni radikal (OH \cdot), ki ima sposobnost penetracije v hidrofobno lipidno področje in tako lahko sproži oksidacijo lipidov. Oksimioglobin je za lipide močnejši prooksidant kot metmioglobin. Metmioglobin lahko katalizira oksidacijo lipidov le v prisotnosti H_2O_2 . Pri reakciji metmioglobina z H_2O_2 nastaneta dve hipervalentni obliki mioglobina, perferilmioglobin in ferilmioglobin, ki sta odgovorni za oksidacijo lipidov (Chaijan, 2008).

Na eni stani so različne oblike mioglobina odgovorne za oksidacijo lipidov, velja pa tudi obratno. Znano je, da produkti oksidacije lipidov, predvsem različni aldehidi, inducirajo oksidacijo mioglobina in pri tem nastane metmioglobin. Aldehidi kot sekundarni produkti oksidacije lipidov spremenijo stabilnost mioglobina v smislu, da pospešijo oksidacijo oksimioglobina in zmanjšajo reduktivno sposobnost metmioglobina, kar poveča prooksidativno sposobnost metmioglobina in posledično poslabšanje barve mesa (Lynch in Faustman, 2000).

Značilna nezaželena sprememba povezana z oksidacijo lipidov, ki se pojavi predvsem pri toplotno obdelanem mesu, je tudi t.i. aroma po postanem, pogretem (WOF, iz angl. Warmed over flavour). WOF je oblika oksidativne žarkosti v toplotno obdelanem mesu, ki se razvije v že nekaj urah ali dneh v nasprotju z običajno žarkostjo, ki se razvije med večmesečnim skladiščenjem ali zamrzovanjem surovega mesa ali maščobe. Toplotna obdelava povzroči porušenje celičnih struktur, inaktivacijo antioksidativnih encimov ter sprostitve kisika in železa iz mioglobina, kar močno pospeši oksidacijo lipidov in tvorbo hlapnih komponent, ki dajo neprijetno aromo (Min in Ahn, 2005). Chen in sod. (1984) ter Bastida in sod. (2009) so pokazali, da na potek oksidacije lipidov v toplotno obdelanem mesu pomembno vplivata tudi končna temperatura in čas toplotne obdelave, kar je povezano predvsem s sproščanjem železa iz mioglobina. Pri počasnejšem segrevanju in s tem daljšim časom toplotne obdelave se iz mioglobina sprostijo več železa kot pri hitrejšem segrevanju. Pomembna pa je tudi temperatura toplotne obdelave, saj se pri višji temperaturi proces oksidacije upočasni, saj se pri tem zniža aktivacijska energija za oksidacijo in tako je ovirana pretvorba hidroperoksida v proste radikale, ki stimulirajo oksidacijske procese. Poleg tega pri višji temperaturi nastajajo tudi produkti Maillardove reakcije, ki imajo antioksidativen učinek in zavirajo proces oksidacije (Bastida in sod., 2009).

Žarkost in WOF se kot sprememba arome v praksi mnogokrat enačita, vendar to nista enaka pojma. WOF senzorično zaznamo kot tujo, neprijetno aromo po lepenki ali oljnati barvi, ki

prikrije zaželeno svežo aromo toplotno obdelanega mesa. Med skladiščenjem toplotno obdelanega mesa opisano WOF aroma sčasoma prekrijejo druge dominantne arome s standardno oksidirano – žarko noto. Pojav žarke arome je posledica tvorbe sekundarnih produktov oksidacije lipidov (karbonili, furani, aldehidi), ki so hlapni in jih zaznamo že pri majhni koncentraciji (Gray in sod., 1996).

Oksidacija lipidov ne pomeni samo poslabšanja senzoričnih lastnosti živila, ampak je neposredno ali posredno povezana še z nekaterimi procesi v živilih, pri katerih se tvorijo nezaželeni, zdravju škodljivi produkti. Hidroperoksidi in ostali prosti radikali, ki se generirajo med oksidacijo lipidov VMNK naj bi bili odgovorni za iniciacijo oksidacije holesterola in s tem tvorbo oksidov holesterola (OH), ki naj bi delovali citotoksično, mutageno in celo karcionogeno (Souza in Silva, 2006; Hur in sod., 2007).

Nekatere raziskave so pokazale tudi povezavo med oksidacijo lipidov in tudi tvorbo mutagenih in karcinogenih HAA. Lipidi in njihovi produkti oksidacije se na različne načine lahko vključujejo v Maillardovo reakcijo (Farmer in Mottram, 1990) in na tak način z interakcijami vplivajo na tvorbo HAA v mesnih proizvodih (Faulkner, 1994; Johansson, 1995). Mehanizem delovanja produktov oksidacije lipidov na tvorbo HAA ni še popolnoma pojasnjen, saj gre bodisi za interakcijo lipidov ali produktov lipidne oksidacije/razgradnje z Maillardovo reakcijo ali reakcijo z nekaterimi produkti Maillardove reakcije, pri čemer se tvorijo piridin oz. pirazin vsebujoči intermediati (Johansson, 1995). Znano je, da lipidi vplivajo na povečano tvorbo pirazinov, piridionov in aldehidov (Gray in sod., 1996).

Zamora in sodelavci (2013) so s pomočjo modelnega poskusa potrdili, da imajo produkti oksidacije lipidov pomembno vlogo pri povečani tvorbi HAA. Pokazali so, da dodatek produkta oksidacije lipida v modelni sistem poveča vsebnost nastalega PhIP za približno 400 % v primerjavi s kontrolo. Produkti oksidacije lipidov naj bi imeli ključno vlogo pri Streckerjevi razgradnji fenilalanina do fenilacetaldehida in s tem tvorbi PhIP. Pokazalo se je, da se lahko produkti oksidacije lipidov obnašajo podobno kot večina ogljikovih hidratov, saj so sposobni tako razgradnje aminokislin kot tudi pretvorbe nekaterih njihovih razgradnih produktov v druge. Posledično to pomeni, da lahko produkti oksidacije lipidov povzročijo tvorbo PhIP v enakem obsegu kot večina ogljikovih hidratov.

2.2 OKSIDI HOLESTEROLA (OH)

Holesterol so prvič odkrili leta 1769 v žolčnih kamnih. Holesterol se nahaja v vseh celicah živali in ljudi.

Holesterol ima pomembno vlogo pri delovanju celičnih membran, saj s tem, ko se vgrajuje med verige maščobnih kislin, preprečuje njihovo kristalizacijo in tako vpliva na fluidnost ter prepustnost membrane. Poleg tega vpliva tudi na aktivnost membransko vezanih encimov ter razgradnjo in absorpcijo maščob. V telesu je holesterol tudi prekurzor za izdelavo steroidnih in spolnih hormonov ter vitamina D. Poleg tega je tudi pomemben gradnik mielinske ovojnice, ki obdaja živčna vlakna in je esencialen za rast in razvoj mladih sesalcev. Organizem lahko pridobi holesterol na dva načina, in sicer z endogeno biosintezo (endogeni holesterol) in z vnosom živil živalskega izvora (eksogeni holesterol) (Arnold in Kwiterovich, 2003; Valenzuela in sod., 2003; Hur in sod., 2006).

Holesterol je tudi pri visokih temperaturah relativno stabilna molekula. Molekula holesterola vsebuje tudi eno dvojno vez med 5. in 6. C-atomom na sterolnem obroču in je zaradi tega pod določenimi pogoji podvržena oksidaciji (Valenzuela in sod., 2003; Hur in sod., 2006).

Oksidi holesterola (OH) so torej produkti oksidacije holesterola in so mu po strukturi podobni. Razlikujejo se le v tem, da vsebujejo še dodatno funkcionalno skupino, kot je hidroksilna, ketonska ali epoksi skupina, ki je vezana na sterolno jedro ali/in stransko verigo molekule (Valenzuela in sod., 2003; Hur in sod., 2006).

OH so zdravju škodljivi, saj so toksični že pri zelo majhnih koncentracijah in jih v telo vnesemo s hrano ali pa nastajajo *in vivo* s peroksidacijo holesterola (Bosseli in sod., 2001). Z *in vitro* poskusi so dokazali citotoksično, mutageno in celo karcinogeno delovanje OH. Tako *in vitro* kot tudi *in vivo* poskusi so pokazali aterogeno delovanje OH (Valenzuela in sod., 2003), povezujejo pa jih tudi z etiologijo rakavih obolenj (Nam in sod., 2001).

2.2.1 Mehanizem nastanka oksidov holesterola

Teoretično se OH tvorijo iz holesterola med postopki obdelave in/ali skladiščenja, še posebej med toplotno obdelavo, ter prisotnost svetlobe in kisika, ki ta proces še dodatno pospešijo. Mehanizem nastanka OH med segrevanjem je dobro raziskan in praktično enak mehanizmu oksidacije lipidov, ki vključuje reakcijo s prostimi radikali, tvorbo hidroperoksidov in razgradnjo (Lee in sod., 2008).

Oksidacija holesterola poteka na podoben način kot oksidacija lipidov, in sicer z avtooksidacijo, fotooksidacijo ali encimsko oksidacijo. Mehanizma oksidacije lipidov in holesterola sta tudi medsebojno povezana, saj je znano, da imajo hidroperoksidi, ki nastajajo kot produkti oksidacije nenasičenih maščobnih kislin ključno vlogo pri oksidaciji holesterola. Prav tako holesterol vpliva na oksidacijo trigliceridov (Tai in sod., 1999; Lercker in Rodriguez-Estrada, 2002; Valenzuela in sod., 2003).

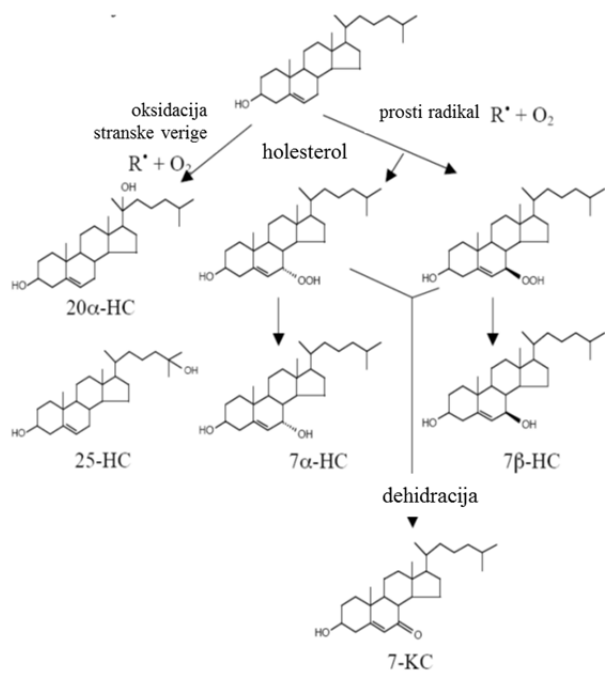
Najpogostejši mehanizem oksidacije holesterola je avtooksidacija, avtokatalitična reakcija holesterola z molekulo kisika. Avtooksidacija holesterola se običajno začne na C-7 atomu z odcepitvijo vodika, ki mu sledi spajanje z molekulo kisika (Slika 1) (Lercker in Rodriguez-Estrada, 2002). Odcepitev vodika iz molekule holesterola povzročijo peroksilni ali oksidni radikali, ki nastanejo kot produkti oksidacije bližnjih VNMK (Hur in sod., 2006).

Pri tem se tvorita primarna OH, izomeri 7-hidroperoksiholesterola (7-HPC), ki se naprej pretvorita v 7 α -hidroksiholesterol (7 α -HC) in 7 β -hidroksiholesterol (7 β -HC), ki ju pogosto najdemo tudi v hrani (Lercker in Rodriguez-Estrada, 2002).

Obe izomeri 7-HPC se z nadaljnjo dehidracijo med segrevanjem pretvorita v 7-ketoholesterol (7-KC). Poleg tega se 7-KC lahko tvori tudi z dehidracijo izomer 7-HC v prisotnosti radikalov. 7-KC se šteje kot glavni oksid holesterola identificiranega v živilskih matriksih (Tai in sod., 1999).

V primeru interakcije molekule holesterola s hidroksilnim radikalom (ROO \cdot) se tvorijo izomere epoksiholesterola, 5,6 α -epoksiholesterol (5,6 α -EC) in 5,6 β -epoksiholesterol (5,6

β -EC) (Lercker in Rodriguez-Estrada, 2002). Epoksidi holesterola so v bistvu sekundarni produkti oksidacije holesterola, ki se formirajo z »napadom« 7-HPC ali kisikovih prostih radikalov na 5,6-dvojno vez v molekuli holesterola (Hur in sod., 2006). Epoksidi se tvorijo, ko je holesterol v kristalinični obliki. V kislem mediju se oba epoksiholesterola z nadaljnjo hidrolizacijo pretvorita v triol, ki je toksičen (Tai in sod., 1999; Lercker in Rodriguez-Estrada, 2002).



Slika 1: Začetne stopnje avtooksidacije holesterola (Lercker in Rodriguez-Estrada, 2002)

Figure 1: Steps of cholesterol autooxidation (Lercker and Rodriguez-Estrada, 2002)

Dejavnik, ki sproži oksidacijo holesterola je tudi svetloba in v tem primeru govorimo o t.i. fotooksidaciji. V prisotnosti svetlobe se tripletni kisik pretvori v singletnega. Holesterol reagira s singletnim kisikom in nastane 5 α -hidroperoksiholesterol (5 α -HPC). Del le-tega se pretvori v 5 α -hidroksiholesterol (5 α -HC), drugi del 5 α -HPC pa se nadalje pretvori v bolj stabilen 7 α - in 7 β -HPC. Istočasno, ko se tvori 5 α -HC, se 7 α - oz. 7 β -HPC pretvori v izomere 7-hidroksiholesterola (7 α -, 7 β - hidroksiholesterol), ki se nadalje lahko pretvorita v 7-KC (Tai in sod., 1999; Lercker in Rodriguez-Estrada, 2002).

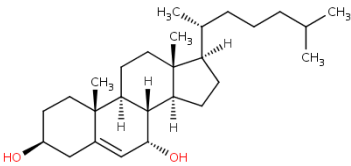
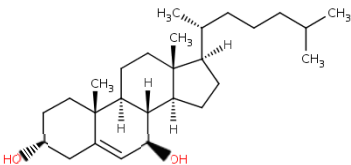
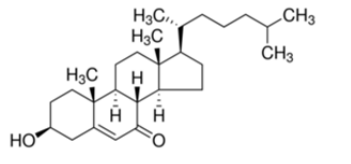
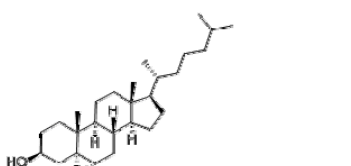
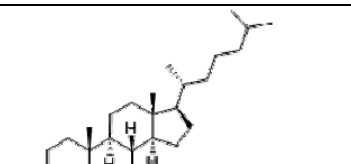
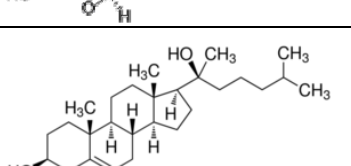
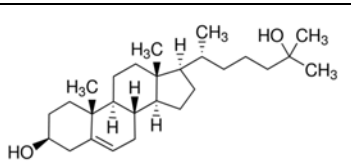
Nekateri OH *in vivo* in v živilih nastanejo tudi kot produkti encimske oksidacije. Raziskave so pokazale, da je pretvorba 5 α -HPC v 7 α -HPC, epimerizacija 7 α -HPC v 7 β -HPC in tvorba 7-HC epimerov iz pripadajočih hidroperoksidov poteka skozi serijo encimskih reakcij. Mono oksigenaze, dioksidaze, dehidrogenaze in oksidaze so glavni encimi, ki sodelujejo pri encimski oksidaciji holesterola. Glavni OH, ki nastanejo kot produkti encimske oksidacije holesterola, so 7 α -HC, 25-hidroksiholesterol (25-HC), 20 α -hidroksiholesterol (20 α -HC), (25 R)-26-hidroksiholesterol in 22 R-hidroksiholesterol (Lercker in Rodriguez-Estrada, 2002).

Vse te encimske in neencimske reakcije oksidacije holesterola potekajo lahko ločeno ali istočasno med procesom proizvodnje, predelave, distribucije in skladiščenja živil (Ubhayasekera in sod., 2004).

2.2.2 Oksidi holesterola v živilih

Preglednica 1: Oksidi holesterola, ki so najpogosteje identificirani v živilih (Tai in sod., 1999; Baggio in sod., 2005)

Table 1: The most frequently identified cholesterol oxides in food (Tai et al., 1999; Baggio et al., 2005)

Ime oksida holesterola	Okrajšava	Formula
7 α -hidroksiholesterol	7 α -HC	
7 β -hidroksiholesterol	7 β -HC	
7-ketoholesterol	7-KC	
5,6 α -epoksiholesterol	5,6 α -EC	
5,6 β -epoksiholesterol	5,6 β -EC	
20 α -hidroksiholesterol	20 α -HC	
25-hidroksiholesterol	25-HC	

V procesu avtooksidacije in fotooksidacije se tvorijo različni OH, katerih vrsta oz. struktura je odvisna od tipa oksidacije ter fizikalnega stanja substrata – holesterola. V primeru, ko se holesterol nahaja v kristalinični obliki, je potek oksidacije v prisotnosti kisika odvisen od urejenosti molekul v kristalu (Valenzuela in sod., 2003).

Do danes so odkrili več kot 80 različnih OH. V preglednici 1 so predstavljeni v živilih najpogosteje identificirani OH.

OH so normalno prisotni v naši prehrani, predvsem v predelanih živilih z veliko vsebnostjo holesterola, kot so jajca, mleko, meso, morska hrana.... Od zgoraj omenjenih OH (preglednica 1) se v predelanih živilih v največjem obsegu tvorijo 7 α - in 7 β -HC, 5,6 α - in 5,6 β -EC ter 7-KC, in sicer v območju ng do mg/g vzorca (Paniangvait in sod., 1995; Valenzuela in sod., 2003).

Med vsemi OH v mesu, kot tudi drugih živilih, prevladuje 7-KC, katerega največje koncentracije so bile določene po toplotni obdelavi in podaljšanem skladiščenju. 7-KC je tudi glavni pokazatelj oksidacije holesterola. Na drugi strani pa se 25-HC pojavlja v bistveno manjših koncentracijah, vendar velja, da sta skupaj s CT že pri majhnih koncentracijah najbolj aterogena med vsemi OH (Kim in sod., 2003; Morales-Aizpurua in Tenuta-Filho, 2005).

Podatki iz literature kažejo, da je skupna vsebnost OH v živilih živalskega izvora običajno večja od 443 μ g/g živila (Tai in sod., 2000) in OH predstavljajo 1–2 % pa celo do 10 % od skupno zaužitega holesterola (Valenzuela in sod., 2003; Morales-Aizpurúa in Tenuta-Filho, 2005; Hur in sod., 2006).

Podatki iz različnih virov o vsebnosti OH v istovrstnih živilih se precej razlikujejo, zato so med seboj težko primerljivi. Te razlike so lahko posledica različnega načina obdelave živila ter uporabe različnih analitskih postopkov. Kvantitativna določitev OH je problematična predvsem zaradi majhnih koncentracij (*ppm* ali *ppb*) le-teh v živilih, poleg tega pa izolacijo posameznega OH ovira bistveno večja vsebnost holesterola, triacilglicerolov, fosfolipidov in ostalih lipidov v živilu (Valenzuela in sod., 2003).

2.2.3 Dejavniki, ki vplivajo na nastanek oksidov holesterola v mesu

Večina raziskav je pokazala, da sveža/surova živila vsebujejo zelo majhne koncentracije OH. Nivo OH močno naraste predvsem med postopki toplotne obdelave in skladiščenjem (Hur in sod., 2006).

Pri vseh vrstah mesa (goveje, piščančje, svinjsko) se je toplotna obdelava mesa izkazala kot glavni razlog za povečano vsebnost OH, še posebej v primeru prekomerne toplotne obdelave. Vsebnost OH v toplotno obdelanem mesu je v območju 180–1900 μ g/g (Paniangvait in sod., 1995).

Stopnja tvorbe OH je odvisna predvsem od temperature in časa toplotne obdelave ter časa in pogojev skladiščenja. Pri tem so pomembni dejavniki, ki vplivajo na tvorbo OH med toplotno obdelavo in skladiščenjem: vrednost pH, svetloba, prisotnost kisika, vodna

aktivnost in prisotnost nenasičenih maščobnih kislin v živilu (Tai in sod., 1999; Hur in sod., 2006; Saldanha in Bragagnolo, 2008).

Pri toplotni obdelavi pride do denaturacije beljakovin, kar povzroči izgubo antioksidativne encimske aktivnosti, sprostitve katalitično aktivnega železa iz mioglobina ter sprostitve kisika iz oksimioglobina. Poleg tega pride tudi do porušitve celične membrane, tako da VNMK pridejo v kontakt s prooksidanti. Toplotna obdelava povzroči tudi toplotno razgradnjo hidroperoksidov do prooksidantov, kot so npr. alkoksil hidroksilni radikali, ki lahko sprožijo tvorbo OH. Tako toplotna obdelava močno pospeši oksidacijo, kar se odraža v povečani vrednosti OH in številu TBK (Souza in Silva, 2006; Hur in sod., 2006; Saldanha in Bragagnolo, 2008).

Vpliv toplotne obdelave na tvorbo OH so s svojo študijo nazorno pokazali Pie in sodelavci (1991), ki so primerjali vsebnost OH v surovi in toplotno obdelani mleti govedini, teletini in svinjini, pečeni na električni ponvi pri temperaturi 135 °C, 10 min na vsaki strani. V toplotno obdelanih vzorcih teh vrst mesa so namreč določili 1,7-, 2,3- oz. 2,5-krat večjo vsebnost OH v primerjavi z istovrstnimi vzorci surovega mesa.

Chien in sodelavci (1998) so opravili študijo glede kinetike oksidacije holesterola med toplotno obdelavo pri 150 °C in času 30 min ali več ter ugotovili, da koncentracija OH narašča s časom segrevanja (Tai in sod., 2000).

Park in Addis (1986) sta pokazala, da vsebnost 7-KC narašča linearno s časom toplotne obdelave, ne pa s temperaturo (Hur in sod., 2006).

To ugotovitev so potrdili tudi Pie in sodelavci (1991), ki je pokazali, da se vsebnost OH pri pečenju govedine, svinjine in teletine v pečici 60, 80 in 90 min pri 220 °C poveča za 3,5-, 5,4- oz. 4,2-krat glede na čas pečenja. To pomeni, da ima čas toplotne obdelave bistveno večji vpliv na tvorbo OH kot sama temperatura.

Thurner in sodelavci (2007) v študiji ugotavljajo, da kratka toplotna obdelava pri relativno visokih temperaturah in uporaba svežega mesa preprečuje nastajanje velikih koncentracij OH.

Obseg tvorbe OH je odvisen tudi od načina toplotne obdelave, saj se med kuhanjem v vodi in toplotni obdelavi v mikrovalovni pečici tvori nekoliko večja količina OH kot med pečenjem. Med pečenjem namreč pride do Maillardove reakcije, pri kateri se tvorijo produkti, ki imajo antioksidativni učinek (Echarte in sod., 2003).

Conchillo in sodelavci (2005) so raziskovali vpliv načina pakiranja na tvorbo OH v piščančjem mesu med skladiščenjem pri temperaturi -18 °C. Pokazali so, da je tvorba OH v surovem piščančjem mesu, piščančjem mesu pečenem na žaru ter praženem piščančjem mesu, pakiranem in skladiščenem v aerobnih pogojih 1,9-, 5,9- oz. 1,9-krat večja, kot če je to meso pakirano v vakuumu. Pri tem je učinkovitost vakuumskega pakiranja za zmanjšanje tvorbe OH med skladiščenjem v zamrzovalniku bistveno večja pri toplotno obdelanih vzorcih kot pri surovih vzorcih. Vsi toplotno obdelani vzorci, ki so bili skladiščeni v aerobnih pogojih, so vsebovali velike količine OH. To je dokaz, da predhodna toplotna

obdelava, pospeši tvorbo OH med samim skladiščenjem (Hur in sod., 2006; Lee in sod., 2008).

Iz preglednice 2 je razvidno, da je tvorba OH odvisna tudi od vrste mesa oz. sestave. Pri tem je ključnega pomena predvsem vsebnost holesterola in delež VNМК. Honikel (2009) je pokazal, da je tvorba OH intenzivnejša v razdetem in toplotno obdelanem mesu.

Osada in sodelavci (1993) so z modelnimi poskusi pokazali, da ko segrevamo sam holesterol, ne pride do tvorbe OH. V primeru segrevanja holesterola v prisotnosti maščobnih kislin, se vsebnost holesterola hitro zmanjša in takoj se začnejo tvoriti OH. To dokazuje, da maščobne kisline sprožijo tvorbo OH. V večjem obsegu se OH tvorijo v prisotnosti VNМК, ki so bolj podvržene oksidaciji (Tai in sod., 2000).

Preglednica 2: Količina (v ppm) posameznih oksidov holesterola v različnih vrstah mesa glede na način obdelave in skladiščenja (povzeto po Tai in sod., 2000)

Table 2: The amount (in ppm) of cholesterol oxides in different type of meat according to the method of heat treatment and storage (Tai et al., 2000)

Vrsta mesa	Obdelava/ hranjenje	Vrsta oksidov holesterola	Količina (ppm)
govedina	sveže, mleto	7 α -HC, 7 β -HC, 5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 7-KC, 20 α -HC, 25-HC	0,14-1,06
	kuhano, mleto	7 α -HC, 7 β -HC, 5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 7-KC, 20 α -HC, 25-HC	0,23-2,11
	zamrznjeno	7 α -HC, 7 β -HC, 5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 7-KC, triol	1-27
teletina	sveže	5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 7-KC	3,3-22
	sveže, mleto	7 α -HC, 7 β -HC, 5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 7-KC, 20 α -HC, 25-HC	0,04-0,71
	kuhano, mleto	7 α -HC, 7 β -HC, 5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 7-KC, 20 α -HC, 25-HC, triol	0,07-0,84
svinjina	sveže	5,6- α -EP, 5,6- β -EP, 7-keto	2,3-6,3
	sveže, mleto	7 α -HC, 7 β -HC, 5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 7-KC, 25-HC, triol	0,04-0,92
	kuhano, mleto	7 α -HC, 7 β -HC, 5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 7-KC, 20 α -HC, 25-HC, triol	0,06-2,25
	posušeno (3 leta, 22 °C)	7 α -HC, 7 β -HC, 5,6 α -EC, 7-KC, triol	12,5- 259,8
piščančje meso	sveže	5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 7-KC	5,8-12,9
	zamrznjeno	7 α -HC, 7 β -HC, 5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 7-KC	2-43
puranje meso	zamrznjeno	7 β -HC, 5,6 α -EC, 5,6 β -EC, 7-KC	6-21

Med posameznimi vrstami mesa je perutninsko meso najbolj podvrženo oksidacijskim procesom in posledično tvorbi OH. Glavni razlog je v tem, da je v perutninskem mesu razmerje med nenasičenimi in nasičenimi maščobnimi kislinami v korist nenasičenih, bistveno večje kot v drugih vrstah mesa (svinjina, govedina, ovčje meso) (Hur in sod., 2006). Echarte in sodelavci (2003) so pokazali, da je vsebnost OH v piščančjih sekljancih, presnih in toplotno obdelanih, 2-krat večja kot pri govejih.

2.3 HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI (HAA)

Prve raziskave povezane s tvorbo heterocikličnih aromatskih aminov (HAA) in njihovimi karcinogenimi učinki segajo v prvo polovico 20. stoletja. Leta 1939 je švedski znanstvenik Widmark iz zapečenega konjskega mesa izoliral karcinogene snovi, ki so inducirale razvoj tumorja na koži miši. Naslednji ključni mejnik pri raziskovanju HAA je postavil Sugimura s sodelavci, ko je leta 1976 s pomočjo Ames testa določil mutageno aktivnost zapečene

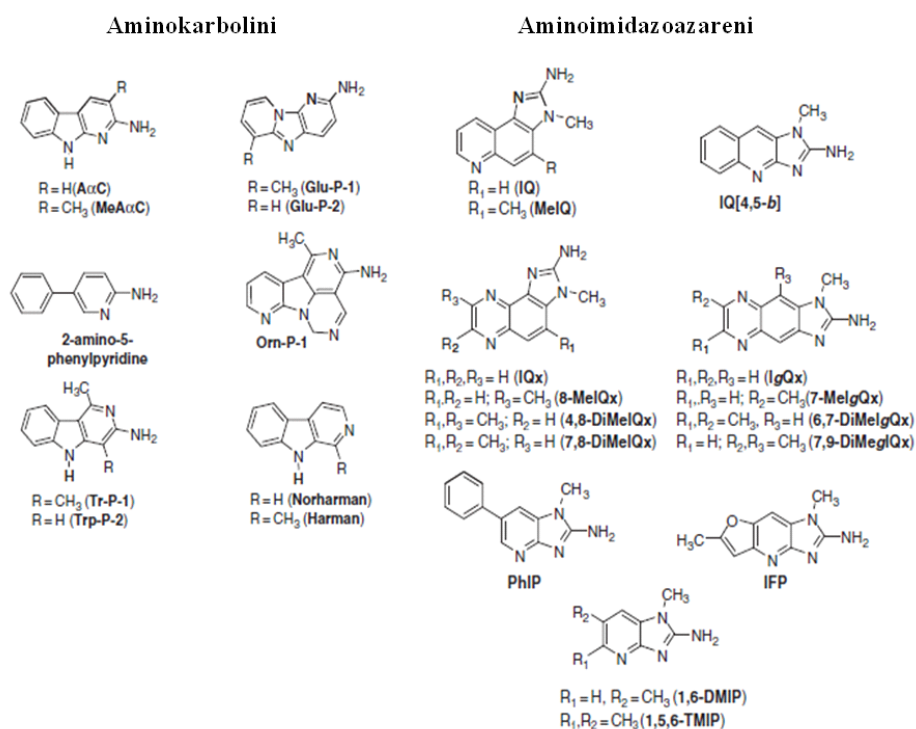
(zažgane) površinske skorje govedine in rib, pečenih nad ogljem (Wakabayashi in sod., 1993; Sugimura, 1997; Skog in sod., 1998).

HAA so spojine z visokim mutagenim in karcinogenim potencialom, ki nastajajo med suhimi postopki toplotne obdelave različnih vrst mesa in rib (Murkovic, 2004; Alaejos in Afonso, 2011).

Nekatere epidemiološke raziskave so pokazale povezavo med pogostim uživanjem mesa in povečanim tveganjem za razvoj rakastih obolenj (Persson in sod., 2003). Dokazano je, da so HAA in njihovi metaboliti prisotni v telesnih tekočinah in tkivih človeka. HAA-DNK povezave so dokazali v tkivih človeka (Vitaglione in Fogliano, 2004), kar kaže na to, da lahko HAA poškodujejo DNK tudi pri tako majhnih količinah (*ppb*), ki so običajno prisotne v mesu toplotno obdelanem do običajnih središčnih temperatur (Turesky, 2007).

Če HAA primerjamo z ostalimi mutagenimi snovmi, ki jih najdemo v hrani, je njihova mutagenost 100-krat večja od aflatoksina B1 in več kot 2000-krat večja od benzo-a-pirena (BaP) (Oz in Kaya, 2011).

2.3.1 Vrste in strukture HAA



Slika 2: Strukturne formule glavnih aminokarbolinov in aminoimidazoazarenov (Turesky, 2010; Alaejos in Afonso, 2011).

Figure 2: Structural formulas of main aminocarboline and aminoimidazoazarenes (Turesky, 2010; Alaejos and Afonso, 2011).

Splošno HAA delimo glede na polarnost v dve skupini: polarne in nepolarne. Polarni HAA (aminoimidazoazareni (AIA) ali IQ tip) imajo imidazokinolinsko, imidazokinoksalinsko ali

imidazopiridinsko strukturo. Napolarni HAA (aminokarbolini ali ne-IQ tip) imajo piridoindolno ali dipiridoimidazolno strukturo (Paise in Knize, 2000; Murkovic, 2004; Turesky, 2007).

V toplotno obdelanem mesu, ribah in njihovih izdelkih je bilo do danes izoliranih in identificiranih že več kot 25 različnih mutagenih in/ali karcinogenih HAA (Alaejos in sod., 2008). Večina do sedaj izoliranih in identificiranih HAA je prikazana na sliki 2. V pečeni govedini, svinjini, ribah in perutnini se med vsemi HAA v največjem obsegu tvorita MeIQx in PhIP. Njihova vsebnost varira v rangu od 0,1 do 100 ng/g toplotno obdelanega mesa (Knize in sod., 1994; Skog in sod., 1998; Nagao, 1999).

2.3.2 Tvorba HAA v mesu

HAA, ki nastajajo v mesu, lahko razdelimo v dve skupini tudi glede na temperaturo, pri kateri nastajajo. Napolarni HAA (ne-IQ tip), imenujemo jih tudi »pirolitični« HAA, so derivati karbolinov in nastajajo s pirolizo aminokislin (AK) in proteinov pri zelo visokih temperaturah (>300 °C). Za tvorbo polarnih, t.i. »termičnih« HAA (IQ-tip) niso potrebne tako visoke temperature, čeprav se pri povišani temperaturi tvorijo hitreje in v večjih količinah. Polarni HAA nastajajo v sistemu kompleksnih reakcij med AK, ogljikovimi hidrati in kreatin(in)om, ki je nujno potreben za tvorbo polarnih HAA (Skog in sod., 1998; Murkovic, 2004).

2.3.2.1 Tvorba aminokarbolinov ali pirolitičnih HAA

Aminokarbolini se tvorijo pri visokih temperaturah – okrog 300 °C s pirolizo AK in proteinov. V procesu pirolize se skozi serijo reakcij prostih radikalov tvorijo številni reaktivni fragmenti, ki se kondenzirajo in tvorijo nove heterociklične strukture – aminokarboline. Njihova sinteza ni odvisna od prekurzorjev kreatina oz. kreatinina, zato jih lahko najdemo tudi v hrani rastlinskega izvora (Wakabayashi in sod., 1992; Sugimura, 1997; Alaejos in Afonso, 2011).

Napolarni HAA se lahko tvorijo pri segrevanju samo ene AK (Murkovic, 2004) ali s pirolizo več aminokislin in proteinov pri visokih temperaturah (Sugimura in Adamson, 2000; Alaejos in Afonso, 2011).

α - in γ -karbolini (A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2) lahko nastanejo s pirolizo triptofana in proteinov živalskega ali rastlinskega izvora, npr. albumina, kazeina ali sojinih glubulinov. Indolov obroč, ki je sestavni del molekul α - in γ -karbolinov, predvidoma izhaja iz triptofana, ni pa izključeno, da lahko nastane tudi iz drugih aminokislin (Johansson in sod., 1995).

Aminokarbolini se pri običajnem pečenju mesa pojavljajo v zelo majhnih koncentracijah (Cheng in sod., 2006).

V primerjavi z drugimi aminokarbolini nastajata β -karbolina, harman in norharman, v 10 do 100-krat večjem obsegu. Tvorita se namreč že pri normalnih pogojih toplotne obdelave (100-225 °C; 10 do 120 min) v prisotnosti kreat(in)ina, glukoze in določenih aminokislin ali mešanice le-teh (Johansson in sod., 1995). Podobno velja tudi za Trp-P-1, da nastaja že pri nižjih temperaturah (Murkovic, 2004). Aminokarbolini se lahko tvorijo iz aminokislin brez

kreat(in)ina, čeprav je bilo v modelnem sistemu dokazano, da dodatek kreatinina poveča količino β -karbolinov (Jägerstad in sod., 1998).

Harman in norharman se od ostalih HAA strukturno ločita po tem, da nimata na obroču vezane amino skupine in ne kažeta mutagenega potenciala, vendar pa njihova prisotnost povečuje genotoksičnost mutagenih HAA (Alaejos in Afonso, 2011).

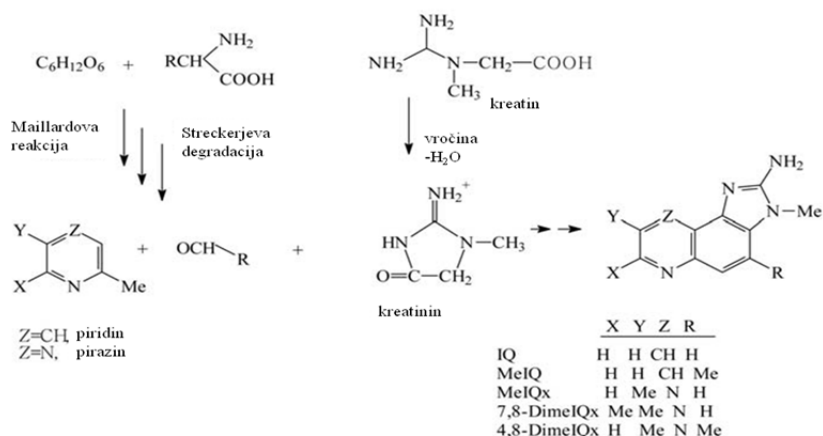
2.3.2.2 Tvorba aminoimidazoazarenov (AIA) oz. »termičnih« HAA

AIA se tvorijo že pri temperaturah običajnih za klasične postopke toplotne obdelave mesa, t.j. pri temperaturi 150–250 °C) (Sugimura in Adamson, 2000; Murkovic, 2004).

Osrednjo pot pri tvorbi AIA predstavlja Maillardova reakcija z vključeno Streckerjevo razgradnjo. Kot produkti serije kompleksnih reakcij med prostimi AK in reducirajočimi sladkorji nastanejo metilirani piridini in pirazini ter t.i. Streckerjevi aldehidi, ki nastopajo kot prekursorji pri tvorbi AIA (slika 3) (Johansson in sod., 1995; Skog in sod., 1998; Murkovic, 2004; Knize in Felton, 2005).

Vsi AIA vsebujejo tudi amino-imidazni del molekule, ki izhaja iz kreatina. Med toplotno obdelavo pri temperaturi nad 100 °C poteče spontana reakcija, pri kateri pride do ciklizacije in odcepitev vode iz kreatina (slika 3). Pri tem nastane kreatinin, ki pri molekulah AIA predstavlja amino-imidazni del, ki je odgovoren za mutagenost. V primeru, da molekula AIA ne vsebuje tega dela, še posebej, če ne vsebuje amino skupine, postane njihova mutagenost zanemarljiva (Skog in sod., 1998; Sugimura in Adamson, 2000; Kizil in sod., 2011). Če kreatin ni prisoten, se IQ in IQx tip HAA ne tvorijo (Murkovic, 2004).

Wyss in Kaddurah-Daouk (2000) navajata, da sta kreatin in/ali kreatinin ključna prekursorja AIA. Dokazana je povezava med mutagenostjo in vsebnostjo kreatina in/ali kreatinina, saj je dodatek kreatina ali kreatin-fosfata v vzorec mesa pred toplotno obdelavo povzročil povečanje mutagenosti za 40-krat in količino AIA do 9-krat.



Slika 3: Tvorba imidazokinolinov (IQ) in imidazokinoksalinov (IQx) (Felton in sod., 2000).

Figure 3: Pathway of IQ and IQx formation (Felton et al., 2000).

Obstajata dve hipotezi za tvorbo AIA: (1) piridin oz. pirazin najprej reagira z aldehydom in šele nato s kreatininom, (2) kreatinin najprej reagira z aldehydom (aldolna kondenzacija), pri

čemer nastane intermediat kreatinin-aldehid, ki se nato poveže s piridinom oz. pirazinom ter tvori imidazo-kino(ksa)lin spojine (Skog in sod., 1999; Murkovic, 2004).

Dokazano je, da največ AIA nastane, če so monosaharidi, proste AK in kreat(in)in v molskem razmerju 1:1:1, kakršno je približno v govejem mesu (Skog in sod., 1998). S povečevanjem prostih AK se poveča tudi nastajanje mutagenih spojin v mesu (Taylor in sod., 1984 a, b). Z večanjem koncentracije monosaharidov pa pride do obratnega učinka – pride do zmanjševanja nastanka HAA (Skog, 1990).

S pomočjo modelnega sistema je bilo ugotovljeno, da posamezna AK določa tako količino kot tudi vrsto AIA. Cistein in treonin kažeta v modelnem sistemu z glukozo in kreatininom največjo mutagenost, sledijo lizin, alanin in glicin. Ti modelni sistemi omogočajo tvorbo 8-MeIQx in 4,8-DiMeIQx, medtem ko se PhIP tvori ob prisotnosti fenilalanina, levcina, izolevcina ali tirozina (Wyss in Kaddurah-Daouk, 2000).

2.3.3 Dejavniki, ki vplivajo na nastanek HAA v mesu

Za proučevanje vpliva posameznih dejavnikov na tvorbo HAA se običajno uporabljajo kemijski modelni sistemi, ki vsebujejo le osnovne prekurzorje (proste AK, sladkor in kreatin), ki imajo ključno vlogo pri tvorbi HAA. S tem izključimo vpliv drugih spojin in kompleksnih reakcij, ki so sicer prisotne v mesu. Posledično uporaba modelnih sistemov omogoča študije vpliva posameznih prekurzorjev ter fizikalnih in kemijskih parametrov na tvorbo HAA z namenom razviti metode in dodatke za zmanjšanje tvorbe mutagenih in karcinogenih HAA v živilu (Pais in sod., 1999; Messner in Murkovic, 2004; Murkovic, 2004; Knize in Felton, 2005). Nekateri HAA, ki so jih prvotno identificirali v modelnih sistemih, so bili kasneje najdeni tudi v mesu (Murkovic, 2004).

2.3.3.1 Vpliv karakteristik mesa

Karakteristike mesa, kamor uvrščamo vrsto mesa, tip mišic in kakovost mesa, pomembno vplivajo na endogeno koncentracijo prekurzorjev in posledično na tvorbo HAA v toplotno obdelanem mesu.

Pri enaki stopnji toplotne obdelave obstajajo razlike v tvorbi posameznih HAA glede na vrsto mesa (preglednica 3). Različne vrste mesa imajo namreč različne količine prekurzorjev, ki so potrebni za nastanek HAA. Toplotno obdelana govedina vsebuje navadno do 20 ng/g skupnih HAA, med katerimi prevladujeta PhIP in MeIQx. V govedini se pojavljata še dva, 4,8-DiMeIQx in IQ, vendar v bistveno manjših koncentracijah. Zelo podobno je pri svinjskem mesu, kjer se ob podobnih pogojih pojavljajo podobne koncentracije in enaki HAA. V perutnini se navadno tvori več HAA, predvsem PhIP, ki lahko presega 100 ng/g. Ostali, MeIQx, 4,8-DiMeIQx in IQ, pa so v podobnih koncentracijah kot pri govedini in svinjini. Večja količina prostih AK pred toplotno obdelavo je verjetno razlog za povečano vsebnost PhIP. Perutnina namreč vsebuje več prostega fenilalanina, tirozina in izolevcina, ki so prekurzorji PhIP. Nekoliko manjše vrednosti so določili v perutnini, ki je bila predhodno marinirana, vendar je bilo to zelo odvisno od sestave marinade (Skog in sod., 1998; Solyakov in Skog, 2002). Vsebnost PhIP je v vseh vrstah toplotno obdelanega mesa običajno največja (0-500 ng/g, v povprečju nekaj 10 ng/g), sledi MeIQx v polovičnih koncentracijah. Ostali HAA, kot npr. IQ, IQx, 4,8-DiMeIQx in MeIQ so pod mejo zaznavnosti oz. se v mesu pojavljajo v manjših

koncentracijah (do 10 ng/g) (Jägerstad in sod., 1998). Eden od razlogov, da se PhIP tvori v največjem obsegu je v tem, da je mehanizem nastanka PhIP bistveno bolj enostaven od ostalih HAA (Knize in Felton, 2005).

Literaturni podatki o vsebnosti HAA v posameznih vrstah mesa so zelo različni, razlogov za to pa je več. Raziskovalci pogosto: (1) pomanjkljivo opišejo postopke toplotne obdelave, (2) uporabljajo metode določanja HAA, ki med seboj niso primerljive in (3) namerno toplotno obdelujejo meso pri višjih temperaturah in daljši čas, da se tvori večja količina HAA. Velika variabilnost podatkov v vsebnosti HAA je odvisna od metode toplotne obdelave, stopnje pečenosti, kakovosti, sestave in geometrije mesa. Posledično se lahko vsebnost razlikuje tudi za več kot 100-krat.

Preglednica 3: Vsebnost posameznih HAA (ng/g) v toplotno obdelanem mesu in ribah (Pais in Knize, 2000)

Table 3: Occurrence of individual HAAs (ng/g) in thermal-treated meat and fish (Pais and Knize, 2000)

Vrsta HAA	govodina	svinjina	perutnina	ribe
IQ	nd-21	nd-10,5	nd-5	nd-4,9
MeIQx	nd-16,4 (max 80)	nd-3,5 (max 45)	nd-3,2 (max 270)	nd-8,3
4,8-DiMeIQx	nd-15	nd-12	nd-4	nd-7
PhIP	nd-18,4 (max 182)	nd-7,4 (max 106)	nd-37,5 (max 480)	nd-3 (max 69)
DMIP	nd-7,2	nd-37	nd-5,9	–
IFP	nd-7,6	nd-2,5	0,9-7	–
AαC	nd-21	nd-sledovi	nd-2 (max>100)	nd-2,3 (max 109)
Trp-P-1	nd-0,5	nd-5,3	nd-1,6	nd-13,3
Trp-P-2	nd-1,7	nd-7,4	nd-0,14	nd-13,1
harman	0,31-28,6	nd-2,5 (max 200)	-	2-130
norharman	0,96-30	nd-10,6	-	2-184

nd – pod mejo zaznavnosti (iz angl. not detected)

Na tvorbo HAA v mesu vpliva tudi zorenje in kakovost mišičnine. V procesu zorenja mesa pride do cepitve proteinov na krajše peptide in proste AK. Polak in sod. (2008) so pokazali, da se z daljšim časom zorenja povečuje količina HAA (MeIQx in PhIP) v toplotno obdelani govedini. To je posledica povečevanja deleža kreatinina, skupnih prostih AK in glukoze v govedini med zorenjem. Glavni vzrok za večjo tvorbo HAA v toplotno obdelanih zorenih vzorcih govedine naj bi bila predvsem večja vsebnost prostih AK. Podobno so Polak in sod. (2009) ugotovili tudi v primeru svinjine, kjer so proučevali tudi vpliv kakovosti mišičnine. Ugotovili so pozitivno korelacijo med povečano tvorbo HAA in BMV (bledo, mehko, vodeno) kakovostjo svinjine, saj ima BMV mišičnina v primerjavi z normalno kakovostjo manjšo vrtdnost pH, kar pospešuje denaturacijo beljakovin in pomeni tvorbo večje količine HAA. Pokazali so, da je vsebnost MeIQx v pečeni svinjini BMV kakovosti za 22 % večja kot v svinjini normalne kakovosti.

Vsebnost vode v mesu pomembno vpliva na tvorbo HAA, saj le-ta omogoča transport v vodi topnih prekurzorjev HAA iz notranjosti na površino mesa, kjer se med toplotno obdelavo tvorijo HAA. V suhih pogojih je povečana tvorba predvsem PhIP, v vlažnih pogojih pa IQ in IQx tipa HAA. Messner in Murkovic (2004) sta s pomočjo modelnega sistema v suhih pogojih dokazala močno povečano tvorbo PhIP, kar je posledica velike izgube vode, ki favorizira predvsem tvorbo PhIP. Z dodatkom snovi, ki izboljšajo sposobnost vezanja vode (sol, sojini proteini, škrob), lahko učinkovito zmanjšamo tvorbo

HAA v mesu, saj s tem omejimo transport prekursorjev iz notranjosti na površino mesa, kjer se HAA tvorijo (Knize in Felton, 2005). Dodatek teh snovi je še posebej pomemben pri izdelkih iz mletega mesa, kjer je zaradi porušene strukture izguba vode še dodatno povečana (Skog in sod., 1998). Persson in sod. (2003) so pokazali, da dodatek NaCl in Na-polifosfata izboljša vezavo vode in zmanjša vsebnost skupnih HAA v pečenih govejih pleskavicah za 38 % v primerjavi s kontrolo. Podoben učinek je bil dosežen tudi v primeru dodatka škroba ali vlaknin. S tem, ko zmanjšamo izgubo vode, se izboljšajo tudi teksturne karakteristike, kot so sočnost in mehkoba, kot tudi aroma in okus mesnih proizvodov.

V mesu se nahajajo tudi maščobe, ki vplivajo na količino HAA v mesu po toplotni obdelavi. Vpliv maščobe na tvorbo HAA ni še povsem pojasnjen, saj v nekaterih primerih maščoba pospešuje tvorbo HAA, nasprotno pa lahko tudi inhibira njihov nastanek. Inhibitorni učinek maščob lahko razložimo s tem, da se z večjim deležem maščob v mesu, zmanjša delež ostalih komponent, ki delujejo kot prekursorji HAA (Hwang in Ngadi, 2002) oz. je to posledica dejstva, da je maščoba bolj učinkovit medij za prenos toplote, kar pomeni krajši čas toplotne obdelave in posledično zmanjšano tvorbo HAA (Alaejos in Afonso, 2011). Na drugi strani lahko maščobe pospešijo tvorbo HAA, saj se med toplotno obdelavo delno hidrolizirajo in tvorijo proste radikale, ki vplivajo na potek Maillardove reakcije in delujejo kot nekakšni katalizatorji nastanka HAA. Možno je tudi, da velika vsebnost maščob v mesu inhibira toplotno razgradnjo nastalih HAA (Skog in sod., 1998; Hwang in Ngadi, 2002)

2.3.3.2 Vpliv pogojev toplotne obdelave

Temperatura, čas in način toplotne obdelave so glavni dejavniki, ki vplivajo na tvorbo HAA v mesu (Johansson in sod., 1995; Skog in sod., 1998; Solyakov in Skog, 2002; Bordas in sod., 2004; Messner in Murkovic, 2004; Knize in Felton, 2005; Turesky, 2007; Polak in sod., 2009).

Arvidsson in sod. (1997) so s pomočjo modelnega sistema pokazali, kako je tvorba HAA funkcijsko odvisna od temperature in časa toplotne obdelave. Pri temperaturi 200 °C količina HAA zelo hitro naraste in v času 5-10 min toplotne obdelave doseže maksimum. Z zviševanjem temperature ob enakem času toplotne obdelave se tvori več HAA in po določenem času doseže svoj maksimum. V primeru podaljševanja časa toplotne obdelave pri temperaturi 225 °C pa je prišlo do zmanjšanja vsebnosti HAA. To je posledica razgradnje nekaterih HAA, kar so potrdili še drugi poskusi na modelnih sistemih (Bordas in sod., 2004). Toplotno najmanj stabilen je PhIP in pri 225 °C se začne razgrajevati. Sledijo 7,8-DiMeQIx, 4,8-DiMeQIx in IQx, ki je najbolj stabilen (Arvidsson in sod., 1997; Messner in Murkovic, 2004). Polak in sod. (2009) pa so nasprotno ugotovili, da je najbolj termolabilen MeIQx, katerega vsebnost se pri središnji temperaturi 80 °C zmanjša za 60 %.

Podaljšan čas pečenja zelo poveča vsebnost predvsem MeIQx, ki naraste z 2 ng/g po 15 min na kar 35 ng/g po 35 min pečenja. Podobno se dogaja z ostalimi HAA, vendar njihovo povečanje ni tako obsežno (Murkovic in sod., 1998). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Knize in sodelavci (1994) ter Skog in sodelavci (1998).

Med praženjem in pečenjem na žaru se tvori veliko večja količina HAA kot pri pečenju v pečici (Knize in sod., 1994). Med praženjem in pečenjem na ploščnem žaru je meso in s tem prekursorji HAA v neposrednem stiku z grelno ploščo. Pri takšnih pogojih se vsebnost vode

na površini mesa zmanjša, nasprotno pa se poveča koncentracija kreatina, glukoze in prostih AK. Posledica tega je, da se večina HAA nahaja na površini toplotno obdelanega beljakovinsko bogatega živila (Jägerstad in sod., 1998). Večja kot je izguba mase med toplotno obdelavo, večja je mutagena aktivnost vzorca, saj se s povečano izcejo poveča prenos v vodi topnih prekurzorjev na površino mesa, kjer se tvorijo HAA. Če se med toplotno obdelavo mesa relativna vlažnost poveča (dodatek pare), se izguba mase in s tem mutagena aktivnost zmanjša (Skog in sod., 2003).

Pri pečenju v pečici pride do manjše vsebnosti HAA na maso izdelka, ker je površina na volumen relativno manjša kot pri pečenju na žaru (Skog in sod., 1997).

Vpliv metode toplotne obdelave na tvorbo HAA je bil dokazan s številnimi poskusi na različnih vrstah mesa. Shin (2005) je pokazal, da se pri različnih načinih toplotne obdelave pleskavic iz svinjskega mesa, največ HAA tvori pri pečenju na žaru (17,2 ng/g), precej manj pa pri pečenju v pečici (5 ng/g) in kuhanju (1 ng/g). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Liao in sod. (2010), ki so ugotovili, da se največ HAA pri enaki temperaturi toplotne obdelave (180 °C) piščančjih prsi tvori pri pečenju na oglju (>112 ng/g), manj pri pečenju na žaru (27,4 ng/g) in najmanj pri pečenju v pečici (4 ng/g). Podobno so ugotovili tudi Gašperlin in sod. (2009), ki so poleg vpliva načina toplotne obdelave, dokazali tudi zaščitni učinek kože pri tvorbi HAA, saj so piščančja prsa s kožo pri enaki metodi toplotne obdelave vsebovala manj HAA.

Oz in sod. (2010) so poleg vpliva metode toplotne obdelave proučevali tudi vpliv različne stopnje pečenosti piščančjih prsi in postrvi. V primeru piščančjih prsi so najvišjo vsebnost HAA določili pri pečenju v ponvi in na žaru, in sicer pri najvišji stopnji pečenosti. V primeru postrvi pa se je tvorilo največ HAA pri pečenju v ponvi, pečenju v pečici in na žaru, prav tako pri največji stopnji pečenosti.

Mikrovalovi so se izkazali kot dober način za predhodno toplotno obdelavo pred nadaljnjimi postopki pečenja, kajti s tem lahko bistveno pripomoremo k zmanjšanju tvorbe MeIQx in PhIP, zaradi izgube prekurzorjev HAA, vode in maščobe (Felton in sod., 1994). V študiji, ki jo je opravil Jinap in sod. (2013), so s predhodno obdelavo piščančjega mesa z mikrovalovi uspeli zmanjšati koncentracijo nastalih HAA. Uporaba mikrovalov za 30 sek in nato cvrenje v palmovem olju sta se izkazala za zelo učinkovit način priprave piščančjega mesa, kajti pri tem se je tvorila zelo majhna količina MeIQx (3,44 ng/g).

Podoben rezultat sta dosegla tudi Knize in Felton (2005), ki sta pokazala, da kombinacija uporabe mikrovalov in nato pečenja govejih pleskavic pri 250 °C zmanjša količino skupnih HAA za 9-kratno vrednost v primerjavi s kontrolo.

2.3.4 Mutagenost in karcinogenost HAA

HAA so promutageni ali prokarcinogeni, ki lahko v aktivni obliki tvorijo DNK povezave. HAA spadajo v skupino indirektnih mutagenov, pri katerih je za izražanje mutagenih lastnosti potrebna metabolna aktivacija (Yamazoe in sod., 1988, Turesky in sod., 1991), ki poteka v dveh fazah. V prvi fazi poteče *N*-hidroksilacija inducirana z encimi iz družine citokrom P450. Pri tem nastanejo *N*-hidroksi HAA metaboliti, ki lahko direktno reagirajo z

DNK in s tem tvorijo HAA-DNK adukte. Lahko pa vstopijo v drugo fazo metabolne aktivacije, kjer poteče esterifikacija *N*-hidroksilamina do reaktivnih *N*-hidroksi estrov, kot so *N*-acetoksi, *N*-sulfoniloksi, *N*-proliloksi in *N*-fosfatil estri. Ti reaktivni metaboliti nastajajo predvsem v jetrih in se nato prenesejo preko krvnega sistema do drugih tkiv, kjer se preko kovaletnih vezi vežejo na DNK, RNK in proteine (Schut in Snyderwine, 1999; Le Marchand in sod., 2002; Turesky in Vouros, 2004; Turesky, 2007). Takšne povezave so našli v skoraj vseh tkivih testiranih glodalcev (miši, podgane) in nečloveških primatov (opice) (Skog, 2004).

Po bioaktivaciji postanejo HAA zelo mutagene spojine, kar so dokazali s številnimi *in vitro* in *in vivo* poskusi (Toribio in sod., 2000). Mutagenost HAA je odvisna od kemijske strukture in njihove zmožnosti tvorbe hipotetičnega reaktivnega nitrenium (R_2N^+) iona (Turesky, 2007).

Za izrednotenje mutagene aktivnosti spojin se uporablja Amesov test, ki je tako primeren tudi za določanje mutagene aktivnosti različno toplotno obdelane na hrane. MeIQx se uporablja kot pozitivna kontrola (Skog in sod., 2003). V Amesovem testu se kot testna mikroorganizma največkrat uporabljata dva seva bakterije *Salmonella typhimurium*, in sicer TA98 in TA100. Sev TA98 je bolj občutljiv na določanje mutacij tipa strukturnih sprememb, medtem ko je sev TA100 bolj občutljiv na določanje mutacij tipa zamenjave baznih parov. Sev TA100 se ne uporablja za testiranje HAA, saj HAA niso občutljivi na TA100. V Amesovem testu s *Salmonella* TA98 vsi AIA, razen PhIP, kažejo visoko mutagenost (Wakabayashi in Sugimura, 1998).

Številni AIA kažejo linearno korelacijo med DNK povezavami in mutagenostjo. Stopnja mutagenosti se določa glede na število HAA-DNK povezav. Več povezav med HAA in bakterijsko DNK nastane, večja je mutagenost HAA (Schut in Snyderwine, 1999). Na število mutacij, ki nastanejo zaradi delovanja HAA, vplivajo različni eksogeni in endogeni metaboli aktivacijski sistemi, različne sposobnosti DNK popravljalnih mehanizmov, različna tarčna zaporedja baznih parov in vpliv sosednjih baz na HAA-DNK aduktih. Zaradi raznolikosti teh dejavnikov prihaja tudi do razlik med biološkimi vplivi HAA v različnih *in vitro* testnih sistemih (Turesky, 2007).

Pogosto se zgodi, da tisti HAA, ki kažejo mutagenost v bakterijskih celicah, kažejo mutagenost tudi v živalskih in človeških celicah, spremeni se le njihova stopnja mutagenosti. Vpliv posameznih HAA na mutacije pri človeku in testnih živalih je zelo različen. Tudi vpliv posameznika (živali ali človeka) ni zanemarljiv. Na izražanje mutagenosti in posledično razvoj raka pri ljudeh pomembno vpliva genetska predispozicija posameznika. Tveganje naj bi bilo odvisno od metabolnega fenotipa posameznika in s tem sposobnosti tvorbe aktivnih karcinogenih spojin ter na drugi strani detoksifikacije in izločanja HAA iz organizma (Nagao, 2000; Alaejos in sod., 2008).

Številni HAA, ki so jih testirali *in vivo* z dodajanjem v prehrano miši in podgan, kažejo karcinogene lastnosti (Sugimura, 1997; Toribio in sod., 2000; Sugimura in sod., 2004). Če so jim izpostavljeni daljše časovno obdobje, le-ti inducirajo nastanek tumorjev na več mestih v različnih organih, med drugim v ustni votlini, jetrih, želodcu, pljučih, mehurju, debelem črevesu, prostati in mlečnih žlezah. IQ je močan jetrni karcinogen pri človeku podobnih opicah. Do nastanka tumorjev običajno pride šele po nekajletni izpostavljenosti

(Turesky, 2007). Ferk in sod. (2010) pa so z *in vitro* poskusom na podganah pokazali, da lahko nekatere naravne substance, kot je ksantohumol, ki je kot flavonoid prisoten v hmelju, učinkovito zaščitijo DNK pred poškodbami, ki jih povzročajo mutageni (IQ). Podoben zaščitni učinek ksantohumola so pokazali tudi Viegas in sod. (2012) na modelnih celicah humanega hepatoma HepG2, ki so bile izpostavljene MeIQx in PhIP. Z Amesovim testom so na bakterijah *Salmonella typhimurium* TA98 so hkrati potrdili, da ksantohumol ni mutagen.

S strani Mednarodne agencije za raziskovanje raka (IARC, International Agency for Research on Cancer) so bili MeIQ, MeIQx, PhIP, A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2 in Glu-P-2 označeni kot potencialno karcinogeni, IQ pa celo kot verjetno karcinogen za človeka (Liao in sod., 2010).

Količine HAA, ki inducirajo razvoj raka pri poskusnih živalih, so lahko za razvoj raka pri človeku zadostne, ni pa nujno. Za razvoj rakastih tvorbo so namreč potrebne številne genetske spremembe, običajno več kot deset (Sugimura, 1997).

V nasprotju s številnimi živalskimi modeli, se pri ljudeh med posamezniki kaže visoka individualna variabilnost v izražanju encimov vključenih v bioaktivacijske in detoksifikacijske procese HAA. Geni, ki pri človeku kodirajo nekatere ključne encimov za metabolizem in biotransformacijo HAA, se v populaciji polimorfno izražajo, kar vpliva na njihovo stabilnost in katalitično aktivnost pri posamezniku, to pa posledično na hitrost, obseg biotransformacije toksikantov in na povečano tveganje za nastanek raka (Turesky, 2005; Alaejos in sod., 2008).

Adukte HAA na DNK so potrdili v več različnih človeških tkivih (debelo črevo, prsi, ledvica), kar dokazuje, da le-ti nastajajo tudi v ne-jetrnih tkivih, kjer lahko povzročijo poškodbe dednega materiala (Turesky, 2007).

Količina dnevno zaužitih HAA je odvisna od vsebnosti HAA v zaužiti hrani, od količine zaužite porcije in od pogostosti uživanja te hrane. Ocena dnevno zaužitih HAA je za posamezne osebe zelo različna in se giblje od 0 do 15 μ g/osebo/dan (Skog, 2002).

Raziskovalci ugotavljajo, da predvsem pogosto uživanje večjih količin toplotno obdelanih mesnih jedi, ki vsebujejo HAA in večje količine maščob, predstavlja tveganje za razvoj raka pri človeku. Nekateri epidemiološke raziskave kažejo, da obstaja povezava med količino dnevno zaužitih HAA in obolevnostjo za rakom na debelem črevesju, želodcu, prostati, mehurju, ledvicah, pljučih, prsih, medtem ko druge raziskave teh povezav ne potrjujejo. Predvsem zaradi kompleksnosti vplivov različnih dejavnikov vlada na tem področju precejšnja zmeda (Sugimura, 1997; Wakabayashi in Sugimura, 1998; Warzecha in sod., 2004; Salmon in sod., 2006). Za kompleksno izrednotenje vpliva HAA na karcinogenezo pri človeku so potrebne še številne raziskave: o tvorbi in vsebnosti HAA v hrani, o vnosu HAA v telo in njihovi biorazpoložljivosti v telesu, o biotransformaciji HAA v organizmu in o učinkih HAA v bioloških sistemih (Toribio in sod., 2000).

2.4 RASTLINSKI EKSTRAKTI

2.4.1 Rastlinski ekstrakti v živilstvu

Rastline oz. njihovi deli ter njihovi ekstrakti se uporabljajo v živilski industriji že mnogo let predvsem kot dodatki, ki prispevajo k oblikovanju in izboljšanju senzoričnih lastnosti živila, kot so okus, aroma in barva (Sasikumar, 2001).

Poleg tega so rastline zelo dober vir protimikrobnih ter antioksidativnih snovi in tako predstavljajo dobro alternativo tradicionalnim kemijskim konzervansom, katerih uporaba je zaradi dokazanih nezaželenih učinkov na zdravje omejena (Ladikos in Laugovois, 1990; Sasikumar, 2001; Hayes in sod., 2011). Uporaba ekstraktov oz. bolj ali manj čistih aktivnih spojin je še bolj primerna kot uporaba samih rastlin, saj je pri tem nezaželen vpliv na senzorične lastnosti živila minimalen oz. nanje sploh ne vpliva (Sasikumar, 2001).

Glavne sestavine rastlin oz. njihovih ekstraktov, ki izkazujejo protimikrobno in antioksidativno delovanje v živilih so fenolne spojine ter druge sestavine eteričnih olj zelišč in začimb (Kähkönen in sod., 1999), kot so terpeni, alkaloidi in polipeptidi (Cowan, 1999).

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, katerih osrednja vloga v rastlini je, da jo ščitijo pred negativnimi zunanjimi dejavniki – napadi virusov, bakterij, rastlinojedih organizmov in pred drugimi zunanjimi dejavniki, ki sprožijo nastanek prostih radikalov (Balasundram in sod., 2006).

Fenolne spojine so heterogena skupina spojin, katerim je skupen vsaj en aromatski obroč in ena ali več hidroksilnih skupin, ki so direktno vezane na aromatski obroč. Glede na njihov osnovni skelet jih razdelimo v naslednje skupine (Balasundram in sod., 2006):

- enostavni fenoli,
- fenolne kisline,
- fenilacetne kisline,
- hidroksicimetne kisline, fenilpropeni,
- naftokinoni,
- ksantoni,
- stilbeni,
- flavonoidi, izoflavonoidi,
- lignani, neolignani,
- bioflavonoidi,
- lignini,
- kondenzirani tanini.

Glavne skupine fenolnih spojin, ki so v rastlinah najbolj zastopane in so pomembne tudi s prehranskega vidika so: fenolne kisline, flavonoidi in tanini (Balasundram in sod., 2006).

Kot bogat vir fenolnih spojin so se skozi številne raziskave pokazale predvsem različne vrste jagodičevja, agrumov, oljke, grozdje, zeleni čaj, žita ter začimbe in zelišča oz. ekstrakti pridobljeni iz njih (Kähkönen in sod., 1999; Balasundram in sod., 2006).

Največ raziskav glede protimikrobne in antioksidativne učinkovitosti je bilo opravljenih predvsem na ekstraktih grozdja oz. grozdnih tropin in grozdnih pešk, ekstraktih zelenega čaja (Mielink in sod., 2006; Perumalla in Hettiarachchy, 2011; Selani in sod., 2011) ter ekstraktih oljčnih tropin in listov oljk (Aytul, 2010; Hayes in sod., 2010).

Glede na dobro poznan mehanizem delovanja sestavin rastlinskih ekstraktov so številne raziskave usmerjene predvsem v iskanje možnosti njihove uporabe in učinkovitosti pri podaljšanju obstojnosti živila v smislu preprečevanja poslabšanja senzoričnih lastnosti in hkrati pri preprečevanju tvorbe zdravju škodljivih snovi med skladiščenjem in toplotno obdelavo živila. Fenolne spojine kot snovi z visokim antioksidativnim potencialom v prvi fazi preprečujejo oksidacijo lipidov in posledično zmanjšujejo možnost za nastanek aterogenih OH in karcinogenih HAA.

2.4.2 Rastlinski ekstrakti in preprečevanje oksidacije lipidov in holesterola

Med običajnimi postopki proizvodnje, predelave, skladiščenja in toplotne obdelave živila potečejo oksidativni procesi, ki vodijo v razvoj nezaželenih senzoričnih sprememb živila ter tvorbe zdravju škodljivih produktov, kot so OH. Te procese lahko upočasnimo oz. preprečimo na različne načine, tudi z dodatkom rastlinskih ekstraktov, ki so bogat vir snovi z antioksidativnim delovanjem.

Odkar je znano, da proces oksidacije holesterola poteka po podobnem mehanizmu kot oksidacija VNMK, preko prostih radikalov, se antioksidanti, ki se uporabljajo za inhibicijo oksidacije maščob in olj, uporabljajo tudi za preprečevanje oksidacije holesterola (Valenzuela in sod., 2004)

Antioksidanti so organske v maščobi ali vodi topne substance, ki delujejo tako, da odstranjujejo aktivne oblike kisika, ki sprožijo fazo iniciacije oksidacije lipidov ali pa tako, da prekinajo verižno reakcijo oksidacije (Valenzuela in sod., 2003; Janoszka, 2010b).

Pri preprečevanju oksidacije holesterola je ključno predvsem to, da antioksidanti lahko reagirajo s peroksilnimi radikali, ki nastanejo pri oksidaciji maščobnih kislin, saj se pri tem tvorijo stabilni radikali, ki ne sprožajo nadaljnje reakcije in s tem je onemogočena tudi oksidacija holesterola (Valenzuela in sod., 2003; Janoszka, 2010b).

Učinkovitost antioksidantov proti tvorbi OH je odvisna od vrste in koncentracije dodanega antioksidanta oz. dodane snovi, ki te antioksidante vsebuje (Janoszka, 2010b).

Fenolne spojine so glavne sestavine, ki nosijo antioksidativno funkcijo v rastlinskih ekstraktih in so poznane tudi kot najbolj učinkoviti naravni antioksidanti. Za fenolne antioksidante predpostavljajo, da zaustavijo avtooksidacijo maščob v živilu tako, da se fenolna spojina (AH) vključi v fazo iniciacije ali propagacije, pri čemer AH reagira s peroksilnim radikalom (LOO[·]), ki je nastal z oksidacijo maščobe. Pri tem antioksidant (AH) deluje tako, da odda vodikov atom peroksilnemu radikalumu (LOO[·]) kar vodi v nastanek stabilnejše oblike lipidnega hidroperoksida (LOOH) in fenolna spojina preide v prosti radikal antioksidanta (A[·]). Prosti radikal antioksidanta (A[·], fenoksilni radikal) je relativno stabilen in obratna reakcija je zelo počasna. Prosti radikali antioksidanta (A[·]) ne inicirajo

verižne reakcije avtooksidacije, razen če so prisotni v presežnih koncentracijah in v tem primeru delujejo kot prooksidanti (Aytul, 2010).

Pri preprečevanju oksidacije holesterola je ključna prav reakcija (7) fenolne spojine kot antioksidanta s peroksidnim radikalom, ki nastane z oksidacijo maščob in le-ta velja kot glavni sprožilec oksidacije holesterola.



Znane so tudi sekundarne reakcije (8-10) prostih radikalov antioksidanta (A^\cdot), pri čemer A^\cdot reagira s peroksilnim (LOO^\cdot) ali alkoksilnim (LO^\cdot) radikalom in nastane kopolimer ali reagira z drugim prostim radikalom antioksidantom. Pri tem nastanejo dimeri ali trimeri, ki imajo zelo nizko antioksidacijsko sposobnost (Aytul, 2010).



Različne začimbe in zelišča, ki se v živilstvu že vrsto let uporabljajo predvsem kot dodatki za oblikovanje in izboljšanje arome, so skozi raziskave pokazale tudi pozitivne učinke pri preprečevanju oksidacijskih procesov. Kot bogat vir fenolnih spojin z visokim antioksidativnim učinkom v jedilnih oljih in mesnih izdelkih so se pokazali predvsem rožmarin, brinove jagode, žajbelj... Podobno učinkoviti so ekstrakti zelenjave (česen, čebula), ki se sicer že tradicionalno uporabljajo pri pripravi živil (Janoszka, 2010) ter tudi ekstrakti pridobljeni iz stranskih produktov, kot so grozdne tropine in peške, oljčne tropine ter jabolčne tropine, ki nastanejo pri predelavi grozdja, oljk in jabolk.

Številne raziskave glede možnosti aplikativne uporabe ekstraktov za podaljšanje obstojnosti mesa so bile narejene na ekstraktih rožmarina. Pri tem se je pokazalo, da ima rožmarin zelo dobro antioksidativno aktivnost, identično čistemu α -tokoferolu in večjo kot butiliran hidrokstitoluen (BHT) (Almela in sod., 2006).

Na tržišču je dostopen ekstrakt rožmarina – oleoresin, ki ga pridobivajo iz listov rožmarina in vsebuje štiri antioksidativne komponente: karnozol, rožmanol, izorožmanol in rožmarindifenol. Ta ekstrakt je brez vonja in okusa in tako ne vpliva na senzorične lastnosti samega živila. Izkazalo se je, da sta predvsem rožmanol in rožmarindifenol najbolj učinkoviti antioksidativni komponenti proti tvorbi OH, celo bolj učinkoviti kot BHA in BHT (Valenzuela in sod., 2003).

Glavne antioksidativne sestavine v rožmarinu so karnozol in karnozolna kislina, rožmarinska kislina, rožmanol, izorožmanol in epirožmanol. V izvlečku listov rožmarina lahko kar 90 % antioksidativnega delovanja pripišemo karnozolu in karnozolni kislini (Huang in Zheng, 2006). Karnozolna kislina je glavna antioksidativna komponenta in njena antioksidativna učinkovitost je več kot dvakrat večja v primerjavi z ostalimi fenolnimi diterpeni in celo nekajkrat večja v primerjavi s sintetičnimi antioksidanti, kot sta BHA in BHT.

Za rožmanol, rožmarikon, karnozol velja, da naj bi bili štirikrat bolj učinkoviti antioksidanti kot BHA in podobno učinkoviti kot BHT (Fernández-López in sod., 2005).

Valenzuela in sodelavci (2004) so v svoji raziskavi pokazali, da ima ekstrakt rožmarina med vsemi preizkušanimi naravnimi antioksidanti največji inhibitorski učinek za tvorbo s toploto induciranih OH.

Fernández-López in sodelavci (2005) so preizkušali antioksidativno učinkovitost vodotopnega in maščobotopnega ekstrakta rožmarina v mesnih kroglicah. Istočasno so testirali tudi učinkovitost ekstrakta česna in citrusov. Najvišja stopnja oksidacijske stabilnosti mesnih kroglic je bila dosežena v primeru ekstrakta rožmarina, kjer pa niso ugotovili nobene bistvene razlike v učinkovitosti med vodnim in maščobnim ekstraktom. Kot glavni antioksidativni komponenti ekstrakta rožmarina so definirali karnozol in karnozolno kislino. Vse omenjene glavne antioksidativne fenolne komponente ekstraktov rožmarina delujejo kot primarni antioksidanti, kar pomeni, da reagirajo z lipidnim ali hidroksilnim radikali in jih tako pretvorijo v stabilne produkte (El-Hameid in El-Badry, 2009) ali pa delujejo kot kelatorji kovinskih (železovih) ionov. Dejstvo, da fenolne komponente ekstraktov učinkovito delujejo tudi kot kelatorji se je izkazalo v primeru boljše oksidativne stabilnosti kuhane govedine z dodanimi ekstrakti v primerjavi s kontrolo. V tem primeru namreč te fenolne komponente delujejo tako, da kelirajo železov ion, ki se med kuhanjem sprosti iz mioglobina in je odgovoren za pospešeno oksidacijo lipidov in posledično tudi oksidacijo holesterola (Fernández-López in sod., 2005).

Dodatek ekstrakta rožmarina kot antioksidanta je pozitivno vplival tudi na barvo mletega govejega mesa med 8-dnevnim skladiščenjem. Ekstrakt rožmarina deluje tako, da znižuje koncentracijo metmioglobina in zvišuje koncentracijo oksimioglobina (Zhang in sod., 2010). Do podobnih ugotovitev je prišel tudi Djenane skupaj s sodelavci (2002), ki je pokazal, da dodatek ekstrakta rožmarina skupaj z askorbinsko kislino močno zavre oksidacijo lipidov in posledično tvorbo metmioglobina, kar je podaljšalo obstojnost govejih zrezkov iz 10 na 20 dni.

V evropski kuhinji se kot začimba tradicionalno uporabljajo tudi brinove jagode, predvsem v Skandinaviji se dodajajo k mesnim jedem in jim dajo značilno ostro aromo, ki so posledica hlapnih komponent eteričnih olj (Loizzo in sod., 2007).

Brinove jagode so tudi bogat vir različnih fenolnih spojin in imajo posledično pomembno vlogo pri preprečevanju oksidativnih procesov z vezanjem prostih radikalov ali kot kelatorji kovinskih ionov, ki povzročajo oksidacijo (Han in Baik, 2008).

Raziskave, ki so jih opravili Miceli in sod. (2011) ter Taviano in sod. (2013), so pokazale, da se vsebnost skupnih fenolnih spojin izraženih kot galna kislina razlikuje glede na vrsto brina in se giblje od 5,14 mg/g (*Juniperus oxycedrus* L. subsp. *Oxycedrus*; *Joo*), 17,89 mg/g (*Juniperus oxycedrus* L. subsp. *Macrocarpa*; *Jom*) do 48,06 mg/g (*Juniperus drupacea*). Opravili so tudi karakterizacijo celotnega fenolnega profila teh vrst brina in pokazali, da so v vseh treh vrstah prisotni podobni flavonoidi, razlika je le v deležu posameznega flavonoida. *Jom* ima višjo vsebnost flavonoidov (12,64 mg/g) kot *Joo* (4,63 mg/g), kar se odraža tudi na večji antioksidativni učinkovitosti *Jom*. Glavna razlika, ki morda odločilno vpliva na večjo antioksidativno učinkovitost *Jom*, je prisotnost fenolnih kislin, kot so galna in

protokatehnična kislina ter tirozol. Prevladuje protokatehnična kislina, ki je poznana kot močan lovilce prostih radikalov.

V zadnjem času je veliko pozornosti usmerjene v pridobivanje ekstraktov iz stranskih produktov, ki nastanejo pri predelavi sadja in zelenjave. Ti stranski produkti so namreč bogat vir fenolnih snovi, hkrati pa predstavljajo tudi veliko obremenitev za okolje.

Eden izmed takšnih primerov je lubje bora, ki je bil še pred nekaj leti v lesni industriji nekoristen odpadke z zelo omejeno uporabo, danes pa ga zaradi velike vsebnosti naravnih polifenolov uporabljajo v prehrani, farmaciji in zdravstvu (Kähkönen in sod., 1999).

Glavne fenolne spojine v lubju bora so katehin, epikatehin, taksifolin in fenolne kisline, med katerimi sta zaradi antitumorgenega in antikarcinogenega delovanja pomembna predvsem katehin in taksifolin, ki kažeta tudi visok antioksidativni potencial (Yesil-Celiktas in sod., 2009). Borovo lubje vsebuje tudi maščobne kisline, alifatske kisline, smolne kisline, sterole in druge lipofilne spojine, ki imajo prav tako antioksidativni učinek in povzročajo sinergijske učinke z drugimi antioksidanti (Braga in sod., 2008).

Med najbolj raziskanimi vrstami bora je francoski obmorski bor *Pinus pinaster*. Iz lubja te vrste bora pridobivajo komercialno dostopen izvleček Pycnogenol® (piknogenol), ki vsebuje 65–75 % proantocijanidinov, med katerimi glavni del predstavljata katehin in epikatehin. Izkazalo se je, da ima piknogenol izjemno antioksidativno učinkovitost. To lahko pripišemo fenolnim kislinam, polifenolom in zlasti flavonoidom, sestavljenim iz enega ali več aromatskih obročev, na katere je vezana še ena ali več hidroksilnih skupin, ki so potencialno dobri lovilci prostih radikalov (D'Andrea, 2010).

Yesil-Celiktas in sod. (2009) so z LC-MS proučevali kemijsko sestavo štirih različnih vrst bora, in sicer *P. brutia*, *P. nigra*, *P. sylvestris* in *P. pinea* ter jih primerjali s piknogenolom. *P. brutia* se je izkazal kot izredno bogat vir taksifolina in tudi katehina, medtem ko so bile pri piknogenolu te vrednosti najmanjše med vsemi preučevanimi vrstami bora. Ob tem so pri vrstah *P. brutia*, *P. nigra* in *P. pinea* določili bistveno večjo sposobnost vezanja prostih radikalov kot pri *P. sylvestris* ter piknogenolu, kar lahko razložimo z manjšo vsebnostjo skupnih proantocijanidinov pri zadnjih dveh.

Pavčnik (2013) je v svojem delu pokazala pozitivne antioksidativne učinke ekstraktov rožmarina, lubja črnega bora ter piknogenola na preprečevanje oksidacije med skladiščenjem govejih sekljancev obogatenih z *n*-3 VNMK. Kot najbolj učinkoviti so se izkazali ekstrakti rožmarina, ki so upočasnili oksidacijo lipidov in holesterola. Ekstrakti borovega lubja in piknogenol so ravno tako učinkovito upočasnili tvorbo oksidov holesterola, nasprotno pa je v primerjavi s kontrolo prišlo do povečanja števila TBK, kar kaže na proces oksidacije lipidov in s tem prooksidativen učinek teh ekstraktov, kar je verjetno posledica prevelike koncentracije dodanega ekstrakta.

Številni *in vitro* in *in vivo* poskusi so pokazali pozitivne učinke ekstraktov pridobljenih iz grozdnih in oljčnih tropin, ki nastanejo kot stranski produkt pri predelavi grozdja oz. oljk.

Grozdne kožice so predvsem bogat vir flavonolov, medtem ko v grozdnih peških prevladujejo oligomerni proantocianidini in manjši delež predstavljajo prosti flavanoli (Perumalla in Hettiarachchy, 2011; Selani in sod., 2011).

Značilno je, da imajo ekstrakti pridobljeni iz grozdnih pešk bistveno višji antioksidativni potencial kot ekstrakti iz grozdnih kožic ali mesa. Antioksidativni potencial ekstraktov grozdnih pešk naj bi bil 20- do 50-krat večji v primerjavi z vitaminom C in E. Glavne komponente ekstrakta grozdnih pešk, ki so tudi odgovorne za visoko antioksidativno učinkovitost, so katehin, epikatehin in epikatehin galat, ki jih uvrščamo med flavonoide oz. proantocianidine (Perumalla in Hettiarachchy, 2011).

Antioksidativno delovanje ekstrakta grozdnih pešk se je v *in vivo* poskusih na mesu pokazalo z zmanjšano tvorbo primarnih in sekundarnih produktov oksidacije lipidov. Dokazano je ekstrakt grozdnih pešk antioksidativno učinkovit v različnih vrstah mesa, kot so surova in kuhana govedina, surova in kuhana svinjina, puranje in piščančje meso, ribe in ribje olje (Perumalla in Hettiarachchy, 2011).

Brannan in Mah (2007) sta pokazala, da je antioksidativni učinek 0,1 % oz. 1 % ekstrakta grozdnih pešk v različnih vrstah surovega in kuhanega zamrznjenega mesa bistveno večji od 0,5 % natrijevega trifosfata, ki se pogosto uporablja kot antioksidant v mesu. Ta raziskava je pokazala, da je ekstrakt grozdnih pešk učinkovit pri preprečevanju tvorbe primarnih in sekundarnih produktov oksidacije v hlajenem in kuhanem zamrznjenem mesu.

Učinkovitost ekstrakta grozdnih pešk je odvisna od vrste mesa. V primeru govejega in svinjskega mesa je ekstrakt učinkovit v surovem in kuhanem mesu in nima negativnega vpliva na barvo mesa. V primeru piščančjega mesa pa so ugotovili večjo učinkovitost v primeru kuhanega mesa kot pri surovem mesu, poleg tega pa so se pojavile nekatere nezaželene spremembe v vonju, aromi in temnejši barvi mesa (Brannan, 2009).

Ahn in sodelavci (2007) poročajo, da se je vsebnost heksanala v kuhanem mletem govejem mesu med hranjenem v hladilniku ob dodatku ekstrakta grozdnih pešk zmanjšala kar za 92 % v primerjavi s kontrolo, kar pomeni tudi močno zmanjšanje pojava postane arome. To kaže tudi na to, da je dodatek tega ekstrakta pri preprečevanju oksidacije bolj učinkovit v kuhanem kot pa v surovem mesu.

Antioksidativno najbolj učinkoviti komponenti plodov oljk ter ekstraktov oljčnih listov in tropin sta oleuropein in hidrokstitirozol, ki je prekurzor oleuropeina. Oba imata kateholno skupino, ki opravlja ključno vlogo pri antioksidativnem delovanju. Oba delujeta kot lovilca superoksidnih radikalov (Aytul, 2010). Aytul (2010) je testiral antioksidativno učinkovitost 1 %, 2 % in 3 % vodnega fenolnega ekstrakta oljčnih listov, s katerim je tretiral goveje meso. Najbolj učinkovit pri preprečevanju lipidne oksidacije je bil 2 % ekstrakt oljčnih listov. Nižja antioksidativna učinkovitost 1 % ekstrakta je verjetno posledica premajhne koncentracije fenolov, ki lahko npr. reducirajo Fe^{3+} ione do njihove še bolj prooksidativne oblike Fe^{2+} in zaradi premajhne vsebnosti antioksidantov v mediju teh prooksidantov ni mogoče nevtralizirati. V primeru 3 % ekstrakta pa gre za negativni učinek prevelike koncentracije antioksidanta, ko pri redukciji kovinskih ionov, tvori še bolj reaktivne produkte (Aytul, 2010).

Hayes in sod. (2010) so pokazali, dodatek ekstrakta oljčnih listov kot bogatega vira fenolnih spojin izboljša tudi sposobnost mesa za vezavo vode. V živilu pride do nastanka protein – fenolnega kompleksa, in sicer sta hidroksilna skupina polifenola in amidna skupina proteina povezana preko vodikove vezi. Nastanek tega kompleksa pozitivno vpliva na sposobnost miofibrilarnih proteinov za vezanje vode in posledično boljšo sočnost mesa (Hayes in sod., 2009).

2.4.3 Rastlinski ekstrakti in preprečevanje tvorbe HAA

Z namenom zmanjšanja tvorbe HAA v mesu so bili opravljeni že številni poskusi modifikacij in optimizacije postopkov toplotne obdelave ter uporabe raznih dodatkov, ki inhibirajo tvorbo HAA. Tvorbo HAA v toplotno obdelanem mesu lahko učinkovito zmanjšamo ali celo preprečimo z optimizacijo časa zorenja mesa (Polak in sod., 2008; Polak in sod., 2009), tako da meso obdelujemo krajši čas pri nižji temperaturi (Skog in sod., 1998; Knize in Felton, 2005; Oz in sod., 2007), s povečano frekvenco obračanja kosov mesa med pečenjem (Salmon in sod., 2000; Knize in Felton, 2005), z uporabo mikrovalov v kombinaciji z drugimi načini toplotne obdelave (Knize in Felton, 2005), s predhodnim paniranjem (Skog in sod., 2003) ali mariniranjem mesa (Salmon in sod., 1997).

Glede na to, da v procesu tvorbe HAA kot vmesni produkti nastajajo prosti piridinski oz. dialkil pirazinski radikali, lahko hipotetično sklepamo, da dodatek snovi z visokim antioksidativnim potencialom ugodno vpliva na zmanjšano tvorbo HAA v mesu, s tem ko vežejo nastale proste radikale (Kikugawa, 1999; Vitaglione in Fogliano, 2004). Posamezen antioksidant ali kompleksna mešanica antioksidantov dokazano inhibira s HAA inducirano mutagenezo in karcinogenezo. To je rezultat delovanja antioksidantov v različnih fazah tvorbe HAA, saj antioksidanti lahko delujejo kot lovilci prostih radikalov in tako onemogočijo tvorbo HAA, ali kot blokatorji encimov, ki sodelujejo pri biotransformaciji in aktivaciji HAA ter tvorbi DNK-aduktov (Vitaglione in Fogliano, 2004).

Mariniranje mesa pred toplotno obdelavo se je v večini primerov izkazalo kot učinkovit način preprečevanja nastanka HAA, saj marinade običajno vsebujejo komponente z visokim antioksidativnim potencialom (Gibis in Weiss, 2012).

Pozitiven učinek mariniranja so pokazali Salmon in sod. (1997), saj je bila vsebnost PhIP v mariniranem piščančjem mesu 92–99 % manjša kot v nemariniranem, presenetljivo pa se poveča količina MeIQx, kar je posledica podaljšanega časa toplotne obdelave in s tem izgube antioksidantov ter prisotnosti rjavega sladkorja v marinadi, ki naj bi stimuliral tvorbo MeIQx.

Podoben učinek so pokazali tudi Quelhas in sod. (2010), ki so goveje meso prehodno marinirali v marinadi iz zelenega čaja. Določili so 74 % manjšo koncentracijo PhIP ter 70 % zmanjšanje vsebnosti skupnih HAA v primerjavi s kontrolo. To je posledica antioksidativnega delovanja katehinov zelenega čaja, ki delujejo kot lovilci prostih radikalov. Močan inhibitorni učinek katehinov zelenega čaja potrjuje tudi modelni poskus (Oguri in sod., 1998), pri čemer je prišlo do znižanja vsebnosti MeIQx na 21 %, PhIP pa na 6,8 % glede na kontrolo. Številne pozitivne učinke je ekstrakt zelenega čaja kot bogat vir flavonoidov, predvsem katehinov, pokazal tudi pri preprečevanju oksidacije lipidov pri različnih vrstah mesa (Zhang in sod., 2010).

Dodatek ekstrakta jabolk, grozdnih pešk, ananasa, ki so bogati s polifenoli zmanjša tvorbo HAA v pečenih govejih pleskavicah (Cheng in sod., 2007). Vpliv fenolnih spojin na tvorbo HAA se je pokazal tudi pri pečenju govejih pleskavic v svežem ekstradeviškem oljčnem olju. V primerjavi s pečenjem v rafiniranim oljčnem olju se namreč tvori bistveno manjša količina PhIP, norharman in harman, bistveno pa se ne zmanjša tvorba MeIQx, ki se očitno lažje tvori ob prisotnosti fenolov (Persson in sod., 2003).

Gibis in Weiss (2012) sta za mariniranje govejih sekljancev uporabila ekstrakt grozdnih pešk v emulziji (voda/olje) ter ekstrakt rožmarina na oljnem nosilcu. Oba ekstrakta sta pokazala pozitiven učinek, saj se je tvorba PhIP in MeIQx zmanjšala za 57–90 %. Pri tem nosilec ekstrakta bistveno ne vpliva na tvorbo HAA, saj tako lipofilni in hidrofilni ekstrakti vsebujejo polifenole, ki inhibirajo tvorbo HAA.

Murkovic in sod. (1998) ugotavljajo, da dodatek rožmarina, timijana in žajblja v goveje sekljance za 60 % zmanjša koncentracijo nastalih HAA v primerjavi s kontrolo. Balogh in sod. (2000) so pokazali, da dodatek rožmarinovega oleoresina v goveje pleskavice zmanjša tvorbo PhIP po toplotni obdelavi za 44 % glede na kontrolo. Prav tako je dodatek ekstrakta rožmarina oljčnemu olju, ki so ga uporabili za cvrenje govejih pleskavic, zmanjšal vsebnost skupnih HAA (Persson in sod., 2003).

Močan vpliv na redukcijo nastalih HAA pri toplotni obdelavi, predvsem MeIQx, ima tudi ekstrakt bora (Ahn in Grün, 2006).

Na trgu so dostopne tudi komercialne marinade, ki običajno vsebujejo mešanico različnih začimb, ki so bogate s polifenolnimi antioksidanti, ki učinkovito zmanjšujejo tvorbo skupnih HAA v mariniranih in na žaru pečenih zrezkov za 57 pa celo do 88 %. Najbolj zastopane antioksidativne komponente v teh marinadah so bile karnozol ter karnozolna in rožmarinska kislina (Alaejos in Afonso, 2011).

Nasprotno, je v nekaterih primerih prišlo celo do prooksidativnega učinka nekaterih dodatkov, kar se je odrazilo v povečani tvorbi nekaterih HAA. Ti nasprotujoči si učinki marinad na tvorbo HAA so povezani predvsem z vrsto in koncentracijo antioksidanta (Gibis in Weiss, 2010), ter načinom, temperaturo in časom toplotne obdelave mariniranega mesa (Salmon in sod., 1997; Lan in sod., 2004; Demašius in sod., 2011). Na tvorbo HAA vpliva tudi čas mariniranja, saj so Busquets in sod. (2006) pokazali, da se količina 8-MeIQx, 4,8-MeIQx, PhIP in 4-OH-PhIP v pečenih piščančjih prsih po enournem mariniranju v vinu poveča, nasprotno pa se po 24-urnem mariniranju količina teh HAA močno zmanjša.

3 MATERIAL IN METODE DE LA

Eksperimentalni del je potekal v več sklopih, v okviru katerih smo opravili ekstrakcijo in karakterizacijo rastlinskih ekstraktov, določili maščobnokislinsko sestavo piščančjega mesa in njegovo oksidativno stabilnost ter vsebnost nastalih oksidov holesterola in HAA v pripravljenih piščančjih sekljancih in mariniranem piščančjem mesu pri določenih pogojih skladiščenja in toplotne obdelave. Shema poteka celotnega eksperimentalnega dela je prikazana na sliki 4.

V prvem sklopu smo iz različnih rastlinskih materialov (brinove jagode, rožmarin, lubje bora, jabolčne, oljčne in grozdne tropine) pripravili ekstrakte in določili vsebnost posameznih in skupnih fenolnih spojin ter ovrednotili antioksidativno učinkovitost ekstraktov. Določene ekstrakte smo v naslednjih sklopih aplicirali v piščančje sekljance oz. jih uporabili v marinadah. V sodelovanju z Nacionalnim inštitutom za biologijo (NIB) smo testirali tudi morebitno citotoksičnost in genotoksičnost nekaterih rastlinskih ekstraktov.

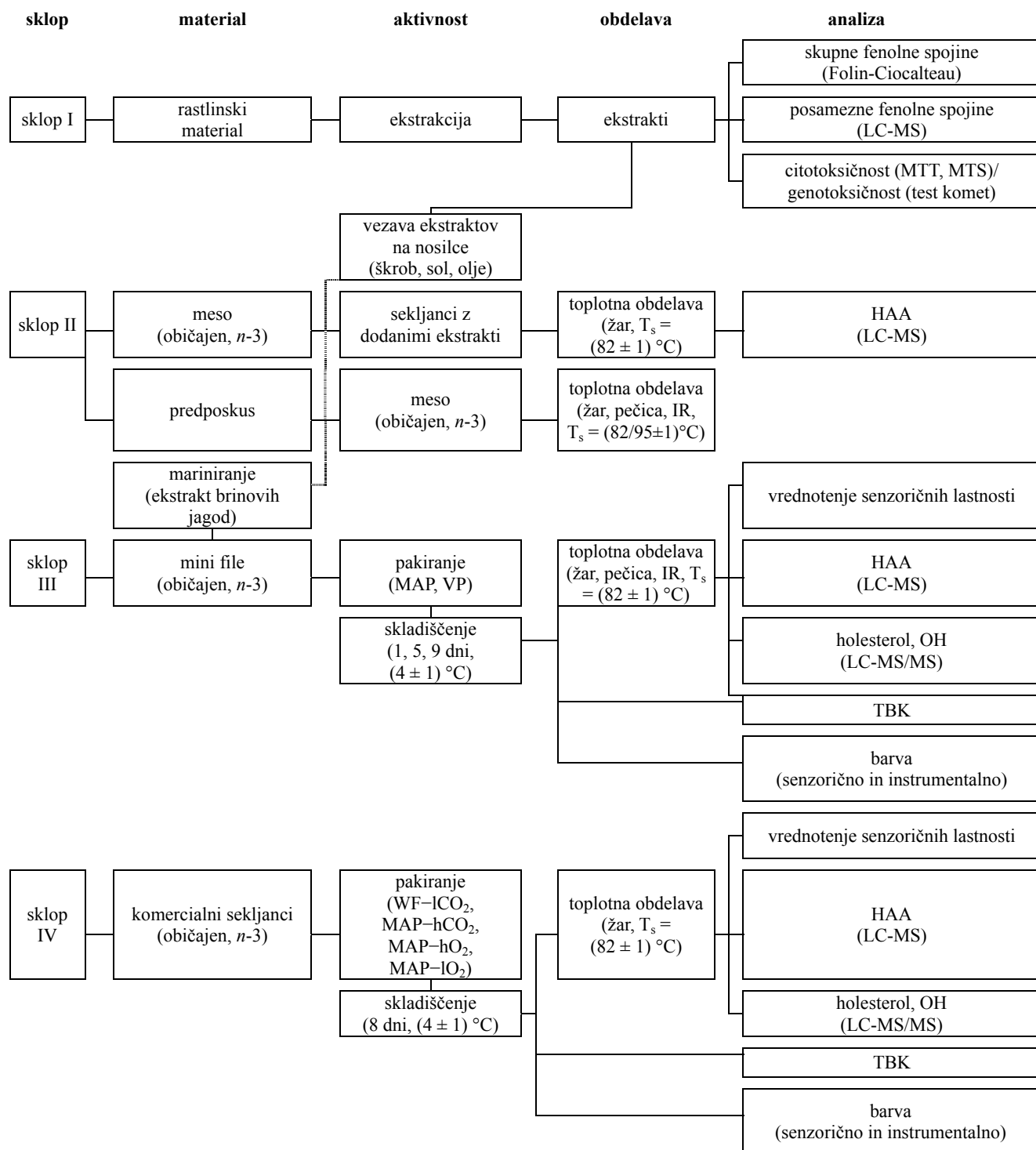
V naslednjem sklopu smo samo nekatere v prvem sklopu pridobljene ekstrakte vezali na različne nosilce (sol, škrob). Tako vezane ekstrakte smo dodali zmletemu piščančjemu fileju ter oblikovali sekljance, ki smo jih nato toplotno obdelali na dvoploščnem žaru in v njih določili vsebnost posameznih in skupnih HAA. V tem sklopu smo na piščančjih filejih (nemariniranih) opravili tudi predposkus, v katerem smo ovrednotili različne vplive, obogatitev mesa z *n*-3 VNMK, uporabo različnih načinov toplotne obdelave in stopenj pečenosti, na tvorbo HAA.

Tretji sklop je bil najobsežnejši in je zajemal pripravo marinad z ekstraktom brinovih jagod (BR4), vezanim na različne nosilce (sol, škrob in olje). S temi marinadami smo marinirali piščančje mini fileje, jih zapakirali (modificirana atmosfera in vakuum) in skladiščili pri običajnih pogojih skladiščenja ($(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$). Vzorce smo odvzeli 1., 5. in 9. dan skladiščenja, vsakič na presnih vzorcih določili oksidativno stabilnost (število TBK ter vsebnost posameznih in skupnih OH) in izmerili barvo. Ob vsakem odvzemu smo vzorce tudi toplotno obdelali ($T_s, 82 \pm 1 ^\circ\text{C}$), pri čemer smo uporabili tri različne postopke toplotne obdelave (dvoploščni žar, pečica in pečica z infrardečimi žarki). Sledili sta senzorična analiza in priprava vzorcev za kemijsko analizo (število TBK, vsebnost posameznih in skupnih HAA ter OH).

V zadnjem sklopu smo preučevali vpliv različnih načinov pakiranja in obogatitve mesa z *n*-3 VNMK na oksidativno stabilnost in tvorbo HAA v komercialno proizvedenih piščančjih sekljancih. Del sklopa je potekal v podjetju Pivka perutninarstvo d.d., kjer je potekala izdelava sekljancev.

Za izvedbo poskusov od sklopa II do IV smo uporabili meso piščancev – brojlerjev provenience *Ross 308* iz redne kontrolirane vzreje podjetja Pivka perutninarstvo d.d.. V teh sklopih so vzporedno potekali poskusi na mesu brojlerjev, krmljenih s konvencionalno (običajno) krmo, ki so predstavljali kontrolno skupino (kontrola) ter tistih, ki so bili krmljeni z *n*-3 VNMK obogateno mešanico žit. Dodatek lanenega semena predstavlja naravni vir *n*-3 VNMK v količini, ki zagotavlja veliko vsebnost *n*-3 VNMK v mesu teh piščancev (*n*-3). S kontrolirano proizvodnjo od priprave krme, vzreje pa do končne predelave mesa podjetje zagotavlja proizvodnjo piščančjega mesa z ugodnim razmerjem *n*-6/*n*-3 VNMK (4,5:1), za

kar je pridobilo tudi nacionalni certifikat Višja kakovost (33203-35/2008/10) z nazivom 'Pivški piščanec z Omega 3'.



Slika 4: Shematski prikaz celotnega eksperimenta po posameznih sklopih

Figure 4: Pathway of whole experiment in individual parts

3.1 MATERIAL ZA RAZISKAVO IN NAČRT DELA

3.1.1 Sklop I: Karakterizacija rastlinskih ekstraktov

Ekstrakte smo pripravili iz različnih rastlinskih materialov. Kot je razvidno iz preglednice 4 smo pri tem uporabili brinove jagode, nabrane na različnih področjih, kupljene brinove jagode, lubje različnih vrst bora ter svež in kupljen (suh) rožmarin. Poleg tega smo pripravili tudi ekstrakte iz jabolčnih, grozdnih in oljčnih tropin, ki nastajajo kot stranski produkt oz. odpad v procesih predelave. V okviru sklopa I smo testirali tudi citotoksičnost in genotoksičnost izbranih ekstraktov na celični liniji humanega hepatoma, HepG2.

Preglednica 4: Rastlinski material za pripravo ekstraktov in oznake ekstraktov

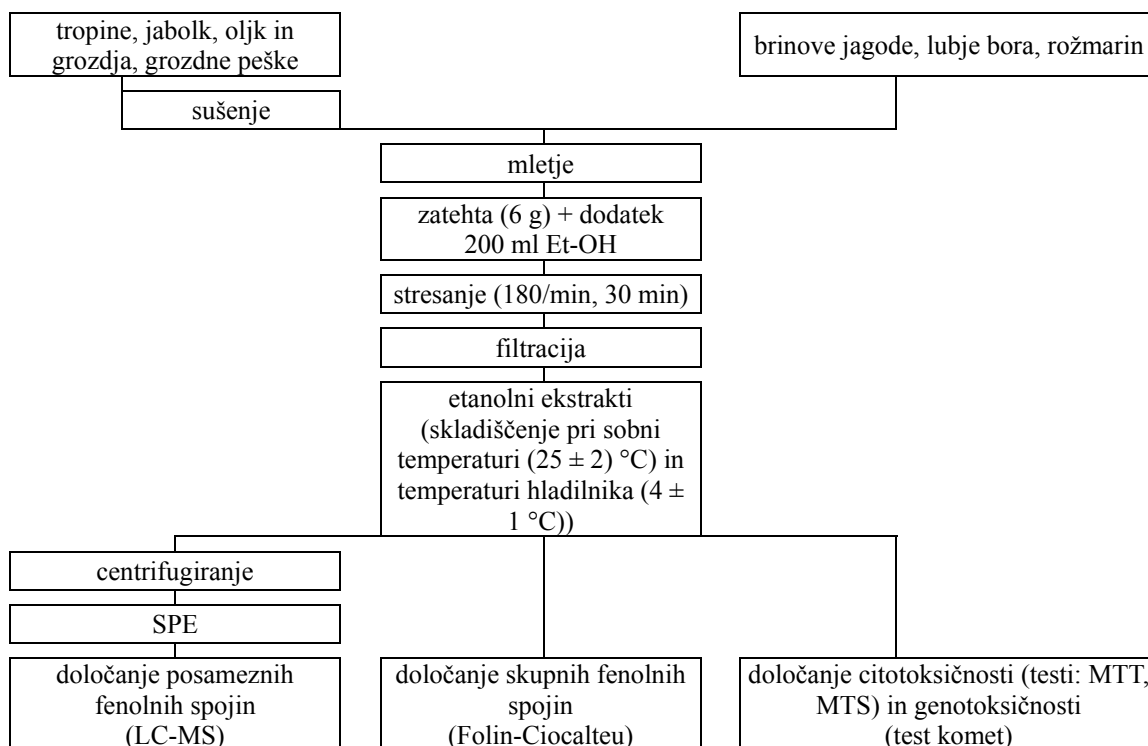
Table 4: Plant material for plant extracts and their codes

Oznaka rastlinskega ekstrakta	Rastlinski material	Ekstrakt uporabljen v sklopu I (testi MTS, MTT, komet)	Ekstrakt uporabljen v sklopu II
BR1	brinove jagode (Volče, 550 m n.m.v.)	×	×
BR2	brinove jagode (Vremščica, 1000 m n.m.v.)		
BR3	brinove jagode (kupljen)	×	×
BR4	brinove jagode (Vremščica, 1000 m n.m.v.; sveže nabrane)	×	×
LB1	lubje črnega bora (območje Kopra)		×
LB2	lubje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.m.v.)		×
LB3	lubje črnega bora (Volče, 550 m n.m.v.)	×	×
LB4	lubje rdečega bora	×	×
LB5	lubje zelenega bora	×	×
LB6	lubje pinje (območje Kopra)	×	×
ROŽ1	svež rožmarin (domač)		×
ROŽ2	suh rožmarin (Kotanyi)	×	×
ROŽ3	suh rožmarin (Maestro)	×	×
ROŽ4	suh rožmarin (območje Kopra)	×	×
JT1	jabolčne tropine sorte Idared	×	
JT2	jabolčne tropine sorte Gloster	×	
JT3	jabolčne tropine sorte Mutsu	×	
OT1	oljačne tropine sorte Belica	×	
OT2	oljačne tropine sorte Črnica	×	
GT1	grozdne tropine sorte Refošk	×	
GP1	grozdne peške sorte Refošk	×	

3.1.1.1 Priprava rastlinskih ekstraktov

Rastlinske ekstrakte smo pripravili po postopku kot prikazuje shema na sliki 5. Jabolčne, oljčne in grozdne tropine ter grozdne peške smo najprej posušili v sušilniku (Instrumentaria ST – 01/02; 24 h, $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$). Nadaljnje faze priprave ekstraktov so bile pri vseh rastlinskih materialih enake. V erlenmajerico s pokrovčkom smo zatehtali 6 g predhodno posušenega in zmletega (Grindomix GM 200, Retsch, Nemčija) posameznega rastlinskega materiala ter dodali 200 ml 70 % prehranbenega etanola (Itrij d.o.o., 3002.9910). Sledilo je 30-min stresanje na stresalniku (IKA minishaker MS2) pri pogoju 180 min^{-1} in sobni temperaturi. Rastropine smo nato prefiltrirali skozi naguban filter papir (najprej tehnični filter papir Sartorius, grade: 388; nato tehnični filter papir Sartorius, grade: 391). Vse skupaj smo prelili v 200 ml bučke in s 70 % prehranbenim etanolom (Itrij d.o.o.,

3002.9910) dopolnili do oznake. Etanolne ekstrakte smo do uporabe skladiščili v hladilniku pri temperaturi $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$. V tako pripravljenih etanolnih ekstraktih smo določili koncentracijo skupnih (Folin-Ciocalteu) in posameznih fenolnih spojin (LC-MS). Pred kvantifikacijo fenolnih spojin z metodo LC-MS smo izvedli čiščenje vzorcev z ekstrakcijo s trdno fazo (SPE) (glej sliko 5). S testi MTS, MTT in komet smo določili tudi njihovo morebitno citotoksično in genotoksično aktivnost.



Slika 5: Shematski prikaz prvega sklopa – priprava rastlinskih ekstraktov in njihova karakterizacija

Figure 5: Pathway of part I – preparation and characterization of plant extracts

3.1.1.2 Celična linija HepG2

Celična linija HepG2 izvira iz človeškega primarnega hepatocelularnega karcinoma in celice imajo neskončno zmožnost delitve. Izbrali smo jih, ker imajo ohranjeno aktivnost nekaterih encimov I. (citokromi P450) in II. (sulfotransferaze, N-acetiltransferaze, glukuranoziltransferaza in glutation-S-transferaze) metabolne faze, ki so pomembni pri aktivaciji in detoksifikaciji mutagenov, ki delujejo na DNK. Posledično celice HepG2 bolje odražajo metabolizem takšnih snovi *in vivo* kot drugi eksperimentalni modeli z metabolno nekompetentnimi celicami in eksogenimi aktivacijskimi mešanici (Knasmüller in sod., 1998b). Te celice so, v nasprotju testnimi bakterijskimi celicami in večino sesalskih celic, sposobne pretvarjati indirektno mutagene v končno mutageno obliko brez dodajanja encimov za aktivacijo promutagenov (Knasmüller in sod., 2004). Iz tega razloga bolje odražajo dogajanja v človeškem organizmu in so rezultati testiranja na teh celicah bolj relevantni za predvidevanje učinkov v človeškem organizmu kot rezultati pridobljeni z drugimi testnimi sistemi, kjer se kot testni organizmi uporabljajo bakterije ali rastline. Celična linija HepG2 je uveljavljena v študijah genotoksičnosti direktnih in indirektnih mutagenov (Knasmüller in sod., 1998a; Valentin-Severin in sod., 2003; Knasmüller in sod.,

2004). Celice HepG2 izražajo tudi tumor supresorski gen *P53* in njegove transkripcijske tarče, zato so primerne za raziskavo odziva celic na poškodbe DNK (Bressac in sod., 1990).

3.1.1.3 Gojenje in presajanje celic HepG2 *in vitro*

Celično linijo HepG2 je poklonil dr. Firouz Darroudi (Oddelek za kemijsko mutagenozo, Univerza v Leidnu, Nizozemska) in jo hrani Nacionalni inštitut za biologijo, oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka v Ljubljani.

Celično linijo HepG2 smo imeli shranjeno v tekočem dušiku (-196 °C). Po odmrznitvi smo celice gojili v plastenkah s perforiranim zamaškom za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm² (Costar, Corning Corporation, ZDA) v gojišču za celično kulturo HepG2 (sestava v Prilogi E) in inkubirali v inkubatorju (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija) pri temperaturi 37 °C in 5 % CO₂ vlažni atmosferi. Delo s celičnimi linijami je potekalo v brezprašni komori (Iskra, Slovenija), torej v popolnoma sterilnih pogojih. Poleg sterilnih pogojev je pri delu s celičnimi linijami pomembno, da gojišče ter vse ostale dodatke in pufre predhodno temperiramo v vodni kopeli na 37 °C. Pritrjene celične linije so rasle na dnu plastenke in, ko so dosegle 70 do 80 % konfluenco, smo jih presadili v novo sterilno plastenko (Costar, Corning Corporation, ZDA). Najprej smo sterilno odstranili izrabljeno gojišče in nato pritrjene celice spirali s 5 ml 1x PBS (pripravljen iz 10x PBS, iz angl. phosphate buffered saline; PAA, H15-011), da smo popolnoma odstranili staro gojišče in mrtve celice. Odstranitev starega gojišča je pomembna za učinkovito delovanje tripsina (proteolitični encimi, ki razgrajujejo medcelične povezave), saj se v gojišču nahaja FBS (serum govejega zarodka, PAA, A15-104), ki inaktivira tripsin. Sprane celice smo nato tretirali z 1,5 ml 0,1 % tripsina za celice HepG2 (sestava v Prilogi E) in pustili delovati 3 do 5 min v inkubatorju (Kambič, laboratorijska oprema, Slovenija) pri 37 °C in 5 % CO₂. Delovanje tripsina smo spremljali pod svetlobnimi mikroskopom (Reichert-Jung, Avstrija) in takoj, ko smo opazili, da so se celice v celoti odlepili od podlage, smo zaustavili delovanje tripsina tako, da smo dodali gojišče (5 ml). Sledilo je 5-min centrifugiranje pri 800 obratih/min (centrifuga tip 3K15). Odstranili smo supernatant in celice nato resuspendirali v 5 ml svežega gojišča. Celično suspenzijo smo potem 8- do 10-krat nežno potegnili s pomočjo brizge skozi injekcijsko iglo in na ta način dobili suspenzijo posameznih celic. Sledilo je štetje celic. Za presajanje celic, zamrzovanje celi in za nadaljnje poskuse smo namreč morali določiti število živih celic. Število in gostoto celic smo določali s štetjem v Burker-Türkove komori. Gre za metodo barvanja z raztopino tripan modrega barvila (Sigma, T-8154) v razmerju 1:5. Pri tem se obarvajo samo celice s poškodovano membrano, torej mrtve celice. Vitalne celice so pravilnih oblik, brezbarvne in se rumeno svetijo, saj je intaktna membrana neprepustna za barvilo. Viabilnost celic mora biti večja od 95 %. Najprej smo odpipetirali 10 µl celične suspenzije in dodali 40 µl tripan modrega barvila (Sigma, T-8154). Nato smo 10 µl te mešanice nanесли na hemocitometer in pod svetlobnim mikroskopom (Reichert-Jung, Avstrija) prešteli žive celice. Število celic/ml smo izračunali po enačbi:

$$N = \frac{n}{4} \times 5 \times 10^4 \quad \dots (11)$$

n je število celic v štirih kvadratih hemocitometra, *N* je število celic v 1 ml suspenzije. Število 5 predstavlja 5-kratno redčitev celic v tripan modrem barvilu, z 10⁴ pa pomnožimo, ker je volumen suspenzije na področju enega kvadrata 1/10.000 ml.

3.1.2 Sklop II: Vežava rastlinskih ekstraktov na različne nosilce in njihov vpliv na tvorbo HAA v piščančjih sekljancih, obogatenih z *n*-3 VNMK

Izbrane, v sklopu I pridobljene, ekstrakte rožmarina, brinovih jagod in lubja bora (Preglednica 4) smo vezali na dva različna nosilca – sol (fino mleta morska sol, Droga) in škrob (Maisita, Agrana Starke GMBH). Tako vezane ekstrakte smo dodali zmletemu piščančjemu fileju ter oblikovali sekljance, ki smo jih nato toplotno obdelali na dvoploščnem žaru (Silex, Model Kitchen Genius 610.95[®], Nemčija) (temperatura plošč žara, T_z , (220 ± 3) °C); središčna temperatura, T_s , (82 ± 1) °C), in v njih določili vsebnost posameznih in skupnih HAA.

Predhodno smo na piščančjih filejih (nemariniranih) opravili predposkus, v katerem smo vrednotili različne vplive, obogatitev mesa z *n*-3 VNMK, uporabo različnih načinov toplotne obdelave in stopenj pečenosti, na tvorbo HAA. Na podlagi rezultatov tega predposkusa smo se namreč odločili, da bomo sekljance z dodanimi ekstrakti iz tega sklopa toplotno obdelali na dvoploščnem žaru, saj se je pri tem načinu tvorilo največ HAA.

3.1.2.1 Material

V sklopih II do IV smo uporabili meso piščancev, krmljenih na dva načina. V obeh primerih gre za piščance iz redne kontrolirane vzreje podjetja Pivka perutninarstvo d.d.. Prvo skupino so predstavljali piščanci, krmljeni z mešanico žit, ki ni vsebovala lanenega semena (običajen). Druga skupina pa so bili piščanci, krmljeni z mešanico, ki je poleg žit vsebovala tudi mleto laneno seme (4,5 %; za ta delež se zmanjša delež koruze) (*n*-3-obogaten).

Preglednica 5: Deleži *n*-3 in *n*-6 VNMK ter razmerje *n*-6/*n*-3 VNMK v običajni in z mletim lanenim semenom obogateni prehrani piščancev

Table 5: Levels of *n*-3 and *n*-6 PUFAs and *n*-6/*n*-3 PUFA ratios in the control and ground-flaxseed-enriched diets of the chickens

Krma	Prehrana piščancev	VNMK (g/100 g skupnih maščobnih kislin)		Razmerje <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3
		<i>n</i> -3	<i>n</i> -6	
Finisher 1	običajna	3,04	36,40	11,98
	<i>n</i> -3-obogatena	10,83	35,55	3,28
Finisher 2	običajna	2,99	35,69	11,95
	<i>n</i> -3-obogatena	11,22	35,75	3,19

Finisher 1, od 11- do 21-tega dneva starosti; Finisher 2, od 21-tega dneva naprej do zakola
Finisher 1, from 11-21 days; Finisher 2, from 21 days to slaughter

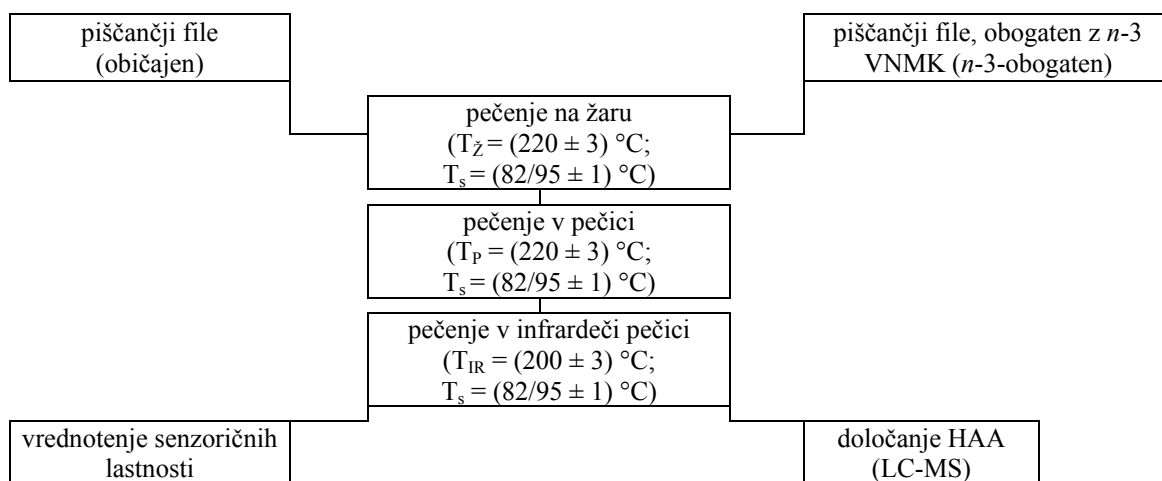
V poskus je bilo vključenih 8000 piščancev provenience *Ross 308*, krmljenih *ad libitum*. Od tega je bilo 4000 piščancev krmljenih s konvencionalno (običajno) mešanico (koruza, ječmen, tritcala, pšenični otrobi, lucerna, olje, proteinske komponente, aminokislini metionin in lizin, apnenec, natrijev klorid, monokalcijev fosfat, mešanice vitaminov in mineralov ter veziva). Drugih 4000 piščancev je bilo krmljenih z *n*-3 VNMK obogateno mešanico žit (mleto laneno seme kot naravni vir *n*-3 VNMK v količini, ki zagotavlja veliko vsebnost *n*-3 VNMK v mesu teh piščancev). Krma piščancev obeh dveh eksperimentalnih skupin je natančneje predstavljena v preglednici 5.

Piščanci obeh eksperimentalnih skupin, kontrolne in *n*-3, so bili v starosti 42 dni in po 12-urnem postu zaklani po standardnem postopku. Piščanci broilerji so bili električno omamljeni, po zakolu je sledila 2-minutna izkrvavitev. Trupi so bili po parjenju (63 ± 1 °C,

45 s) mehansko oskubljeni. Sledila je mehanska evisceracija, potem ko je temperatura trupov dosegla središčno temperaturo ($(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$; približno 2,5 h *post mortem*), pa je sledil razsek trupov. Za izvedbo posameznega sklopa smo nato uporabili določen del piščančjega trupa, kar je pri vsakem sklopu tudi navedeno.

3.1.2.2 Izvedba predposkusa

V okviru predposkusa smo uporabili polovice svežega fileja (*m. pectoralis superficialis*), jih stehtali (tehtnica Soehle, Nemčija) in nato toplotno obdelali do dveh različnih središčnih temperatur (T_s), (82 oz. 95 ± 1) $^\circ\text{C}$) (vbodni termometer Testo 0554 1765 USB-Interface, Nemčija). Pri tem smo uporabili tri različne postopke toplotne obdelave, in sicer pečenje na dvoploščnem žaru s teflonsko prevleko (Silex, Model Kitchen Genius 610.95[®], Nemčija) in temperaturo plošč (220 ± 3) $^\circ\text{C}$, pečenje v pečici (Gorenje) pri temperaturi (220 ± 3) $^\circ\text{C}$ in infrardeči pečici (pečica IR; Gorenje) pri temperaturi (200 ± 3) $^\circ\text{C}$. Čas toplotne obdelave pri posameznem postopku je različen, saj je pogojen s samim postopkom, z želeno T_s ter maso samega fileja, in se posledično giblje med 40 in 70 min. Pri posameznem postopku toplotne obdelave smo pripravili po šest polovic filejev piščancev, krmljenih z običajno krmo (kontrola), pri čemer so bili trije obdelani do T_s (82 ± 1) $^\circ\text{C}$) in ostali trije do T_s (95 ± 1) $^\circ\text{C}$). Vzporedno smo pri enakih pogojih pripravili tudi šest polovic filejev piščancev, krmljenih s krmo obogateno z *n-3* VNMK (*n-3*). Skupaj smo pripravili 36 vzorcev, za vsak način toplotne obdelave po tri paralelke.



Slika 6: Shematski prikaz predposkusa
Figure 6: Pathway of the pre-experiment

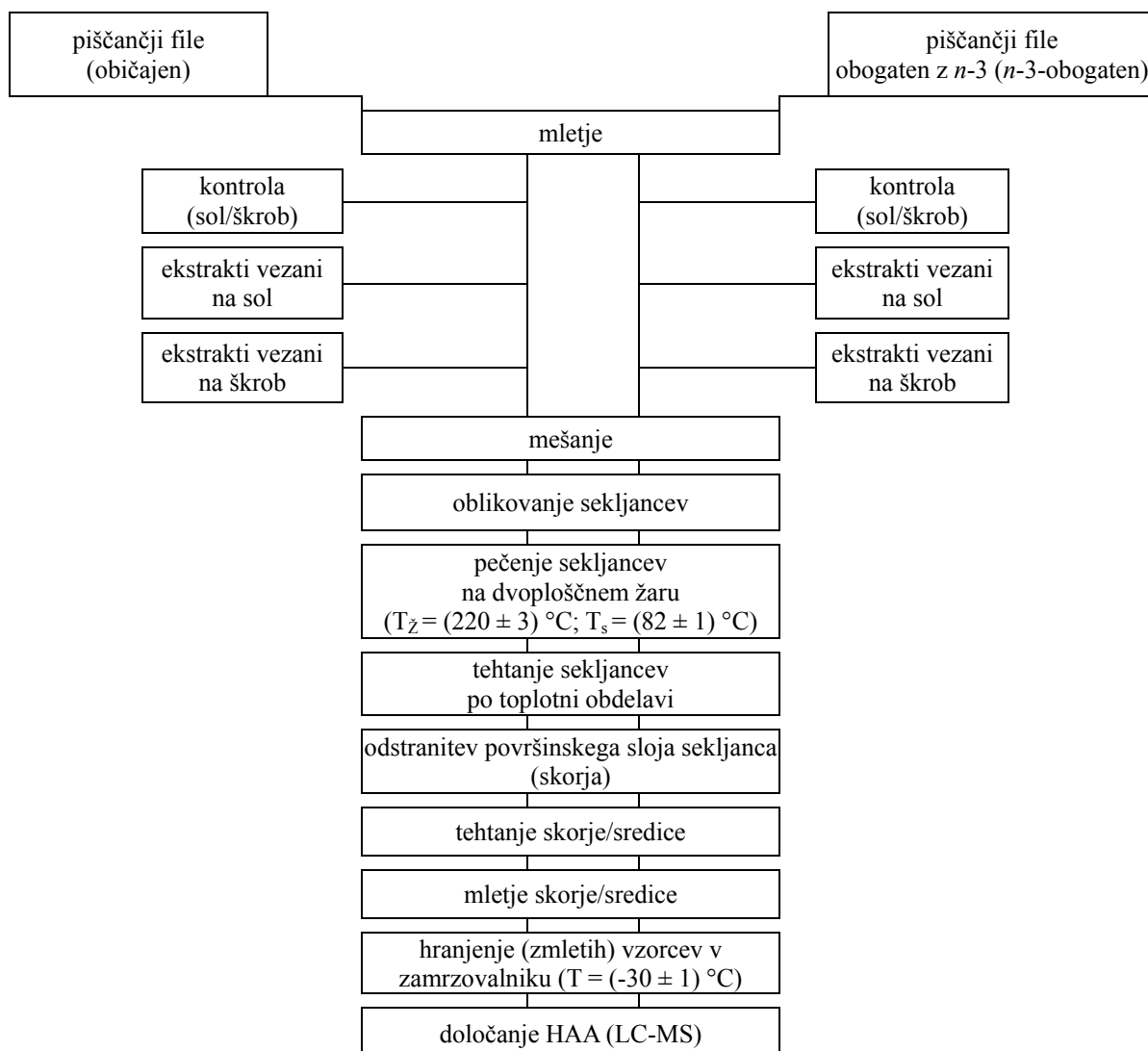
3.1.2.3 Vezava rastlinskih ekstraktov na nosilce

Na dva nosilca (sol in škrob) smo vezali ekstrakte, ki smo jih pripravili v sklopu I (Preglednica 4). Vezavo ekstraktov na sol smo opravili tako, da smo v 100 ml stekleno bučko najprej odpipetirali 10 ml ekstrakta, zatehtali 10 g soli ter na koncu dodali še 50 ml 70 % prehrabnega etanola (Itrij d.o.o., 3002.9910). Vse skupaj smo dobro premešali in nato je na rotavaporju (Büchi, Rotavapor R-114[®] z Vac V-500, Švica) sledilo odparevanje etanola in vode do suhega (pri polnem vakuumu - 5 mbar). V primeru vezave ekstraktov na škrob smo zatehtali 10 g škroba in odpipetirali 10 ml ekstrakta, premešali in vzorce nato sušili v mikrovalovni pečici (900 W). Zaradi hitrega izhlapevanja etanola je bilo potrebno v

primeru uporabe mikrovalovne pečice sušenje izvajati v kratkih intervalih (15-20 s) in vmes vzorce večkrat temeljito premešati in paziti, da se ne pregrejejo. V zadnji fazi je v obeh primerih sledilo še končno sušenje v sušilniku (S-50, Kambič laboratorijska oprema; $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 12 h). Na koncu smo suhe vzorce fino zmleli v mlinčku.

3.1.2.4 Priprava sekljancev

Za pripravo sekljancev smo uporabili mišico prsnega fileja (*m. pectoralis superficialis*) piščancev iz obeh skupin (običajen, *n*-3-obogaten) (postopek vzreje in zakola piščancev je opisan v točki 3.1.2.1). File smo zmleli v mlinu (Grinndomix GM 200, Retsch, Nemčija) in dodali po 1,6 % soli oz. škroba z vezanim posameznim ekstraktom (postopek vezave je opisan pod točko 3.1.2.3). Vse skupaj smo dobro premešali v mešalniku in s petrijevkami oblikovali sekljance (100 g), jih stehali in nato toplotno obdelali na dvoploščnem žaru ($T_{\text{ž}} = (220 \pm 3) ^\circ\text{C}$; $T_{\text{s}} = (82 \pm 1) ^\circ\text{C}$). Sledila je končna priprava in shranjevanje sekljancev za nadaljnje kemijske analize kot je podrobno opisano pod točko 3.1.2.2 ter prikazano na sliki 7.



Slika 7: Shematski prikaz poteka osrednjega poskusa sklopa II
Figure 7: Pathway of the main experiment of part II

Za vsako skupino (običajen, *n*-3-obogaten) smo pripravili skupaj po 64 sekljancev. V primeru vezave na sol smo imeli skupno 12 različnih ekstraktov, na škrob pa smo vezali 13 različnih ekstraktov, kar pomeni, da smo skupaj imeli 24 oz. 26 vzorcev, saj smo vse sekljance pripravljali v dveh paralelkah. Ostali vzorci so bili kontrola – samo dodatek soli oz. škroba brez vezanih ekstraktov.

3.1.3 Sklop III: Marinade z ekstraktom brinovih jagod in njihov vpliv na tvorbo produktov oksidacije in HAA v piščančjih mini filejih, obogatenih z *n*-3 VNMK

Sklop III je nadaljevanje oz. nadgradnja sklopa II, kljub temu da so poskusi v posameznem sklopu potekali popolnoma neodvisno. Namen tega sklopa je bil predvsem ovrednotiti vpliv mariniranja na tvorbo HAA in oksidativno stabilnost piščančjega mesa. Zato smo piščančje mini fileje marinirali v marinadah z dodatkom ekstrakta brinovih jagod (BR4, preglednica 4). Ekstrakt brinovih jagod smo predhodno vezali na tri različne nosilce (sol, škrob in olje), preko katerih smo ga aplicirali v marinade. Natančen potek poskusa je predstavljen na sliki 8, iz katere je razvidno, da smo tudi v tem sklopu izvedli poskus na običajnem piščančjem mesu (običajen) in obogatenem z *n*-3 VNMK (*n*-3-obogaten).

3.1.3.1 Vezava ekstrakta brinovih jagod na olje

V erlenmajerico smo zatehtali 18 g predhodno fino zmletih brinovih jagod in dodali 250 ml olja (100 % sončnično olje Cekin Vital, tovarna olja Gea) ter vse skupaj postavili za 1 h na ultrazvočno kopel (Bransonic 3510E – DTH, Branson, Nemčija). Sledila je filtracija skozi 5 plasti gaze v 250 ml bučko in dopolnitev z oljem do oznake.

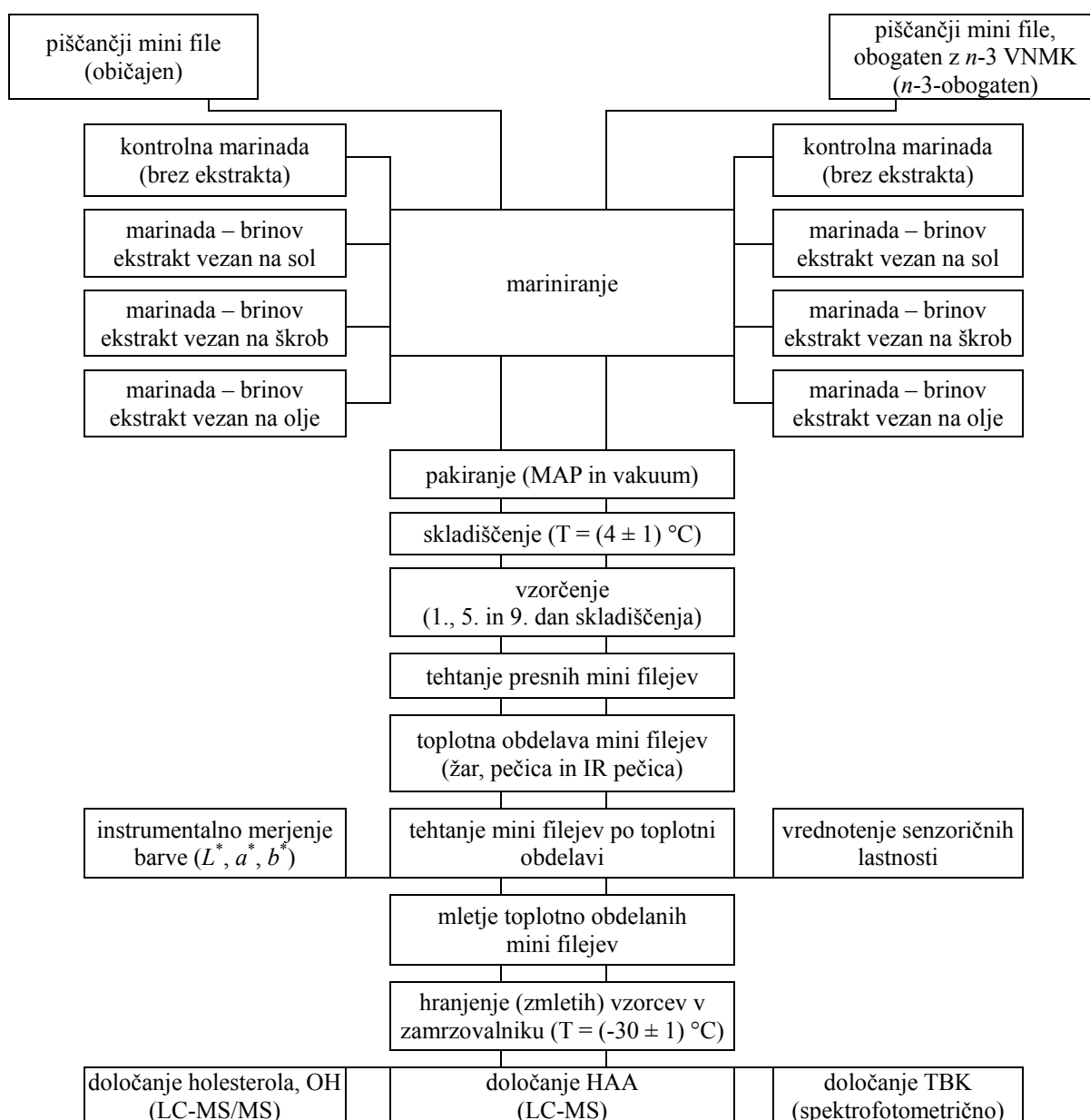
3.1.3.2 Priprava marinad

Predhodno smo pripravili štiri marinade, pri čemer je bila ena kot kontrolna marinada. Kontrolno marinado smo pripravili tako, da smo zatehtali po 1 g soli (fino mleta morska sol), škroba (Maisita, Agrana Starke GMBH) in olja (100 % sončnično olje Cekin Vital, tovarna olja Gea) ter 2 g vode na 100 g mesa. Vse komponente smo temeljito zmešali v mešalniku (HR2860, Philips), da smo dobili homogeno zmes, ki smo jo nato uporabili za mariniranje. Po enakem postopku smo pripravili tudi ostale tri marinade, v katere smo dodali ekstrakt brinovih jagod, predhodno vezan na tri različne nosilce. Pri prvi marinadi smo ekstrakt brinovih jagod vezali na sol, pri drugi na škrob in pri tretji marinadi na olje. Vse ostale komponente in njihove zatehte so bile enake kot pri pozitivni kontrolni marinadi. Postopek vezave ekstrakta brinovih jagod na sol oz. škrob je opisana pod točko 3.1.2.3, na olje pa pod točko 3.1.3.1.

3.1.3.3 Mariniranje, pakiranje in toplotna obdelava mini filejev

Za izvedbo eksperimenta smo uporabili mini fileje (*m. pectoralis minor*) piščancev, krmljenih z običajno krmo (običajen), in piščancev, krmljenih s krmo obogateno z *n*-3 VNMK (*n*-3-obogaten). Znotraj posamezne skupine smo imeli glede na vrsto marinade štiri podskupine (slika 8). Za vsako podskupino smo odbrali 38 mini filejev, vse skupaj stehali in dodali ustrezno količino marinade glede na maso mesa (glej točko 3.1.3.2). Sledilo je pakiranje mariniranih mini filejev. Iz vsake podskupine smo pripravili po tri embalažne enote (3 × 12 mariniranih mini filejev = 36) (polipropilenski pladenj, G018110, Marcato Sp. Z.o.o., Poljska; PP/PE folija, Lin Top PP HB A 50; Lincac Plastic Pointivy, Francija), pakirane v modificirano atmosfero (30 % CO₂, 20 % O₂, 50 % N₂), in eno vakuumsko

pakirano embalažno enoto (1×2 marinirana mini fileja). Vse embalažne enote smo nato skladiščili pri temperaturi (4 ± 1) °C in opravili vzorčenje 1., 5. in 9. dan od dneva pakiranja (le po eno vakuumsko pakirano embalažno enoto smo hranili do devetega dneva). Ob vsakem vzorčenju (1., 5. in 9. dan) smo na presnih mini filejih najprej instrumentalno izmerili barvo. En del mini filejev (4) iz posamezne podskupine smo zmleli in nato vakuumsko zapakirali ter jih zamrznili do nadaljnjih analiz, preostali del mini filejev (8) pa smo toplotno obdelali do T_s (82 ± 1) °C. Za toplotno obdelavo smo uporabili tri različne postopke, in sicer pečenje na žaru, pečenje v pečici in pečenje v pečici IR (enaki pogoji kot pri točki 3.1.2.2). Vsi nadaljnji postopki obdelave, priprave in shranjevanja so prikazani na sliki 8.



Slika 8: Shematski prikaz poteka eksperimenta sklopa III

Figure 8: Pathway of the experiment of part III

Poslabšanje barve in vsebnost kreatina/kreatinina (prekurzor HAA) smo določili na presnih mini filejih, senzorične lastnosti, vsebnost holesterola, oksidov holesterola (OH) in heterocikličnih aromatskih aminov (HAA) na vzorcih po toplotni obdelavi, medtem ko smo število TBK ovrednotili tako na presnih kot toplotno obdelanih vzorcih.

Instrumentalno merjenje barve smo opravili v štirih paralelkah, določitev števila TBK v dveh paralelkah, vsebnost kreatina/kreatinina, holesterola, OH in HAA pa smo določili na povprečnem vzorcu vsake od podskupin.

3.1.4 Sklop IV: Različni aerobni pogoji v embalažni enoti in njihov vpliv na tvorbo produktov oksidacije in HAA v komercialnih piščančjih sekljancih, obogatenih z *n*-3 VNMK

V tem sklopu smo v sodelovanju s podjetjem Pivka perutninarstvo d.d. izdelali piščančje sekljance po standardni recepturi. Podobno kot v sklopu II in III, smo tudi v tem primeru pripravili dve skupini sekljancev iz mesa piščancev, krmljenih z običajno krmo (običajen), in piščancev, krmljenih s krmo obogateno z *n*-3 VNMK (*n*-3-obogaten) (slika 9). Natančen postopek vzreje in zakola piščancev je opisan po točko 3.1.2.1.

3.1.4.1 Izdelava, pakiranje in skladiščenje sekljancev

Za izdelavo sekljancev smo izbrali meso prsi (mišici *m. pectoralis major* in *m. pectoralis minor*) in stegen (mišice *m. biceps femoris*, *m. adductor longus*, *m. adductor magnus*, *m. semitendinosus*, *m. tibialis anterior* in *m. gastrocnemius*), ga zmleli (premer luknjače volka, 6 mm), začinili in zmešali. Dodatki in začimbe, ki smo jih dodali, so naslednji: naravne začimbe (npr. česen), prehranska vlaknina (bambus), dekstroza, natrijev acetat, natrijev glutamat, askorbinska kislina, natrijev difosfat in barvilo karmin. Oblikovali smo sekljance ovalne oblike (*ca.* 140 mm × 100 mm × 10 mm) in maso približno 120 g. Na posamezen polipropilenski pladenj (G018110, Marcato Sp. Z.o.o., Poljska) smo položili po štiri sekljance in jih tako pripravili za pakiranje.

Pripravili smo skupno 48 pladnjev piščančjih sekljancev, ki smo jih glede na uporabljeno meso razdelili na dve skupini: običajen (24 pladnjev) in *n*-3-obogaten (24 pladnjev). Vsako od teh dveh skupin pa smo glede na sestavo atmosfere razdelili na štiri podskupine po 6 pladnjev s štirimi sekljanci. Celoten eksperiment je prikazan na sliki 9. Eksperiment smo opravili v treh proizvodnih ponovitvah (48 pladnjev × 3).

Za pakiranje smo uporabili dve vrsti folije z naslednjo prepustnostjo pri temperaturi 23 °C in 0 % relativni vlažnosti:

- večplastna polivinilkloridna (PVC) folija (debeline, 13,5 µm) (Zenium M; Linpac Packaging, Pointivy, Francija): prepustnost kisika, 0,007 m³ (m³ × 24 h × bar)⁻¹; prepustnost ogljikovega dioksida, 0,043 m³ (m³ × 24 h × bar)⁻¹; prepustnost vodnih par, 0,162 kg (m² × 24 h × bar)⁻¹; prepustna za zrak.
- zelo visoko barierna prekrivna folija iz polipropilena in polietilena (PP/PE) (debeline 50 µm) (Lin Top PP HB A 50; Linpac Plastic Pointivy, Francija): prepustnost kisika, <5 × 10⁻⁶ m³ (m³ × 24 h × bar)⁻¹; prepustnost ogljikovega dioksida, <25 × 10⁻⁶ m³ (m³ × 24 h × bar)⁻¹; prepustnost vodnih par, <0,003 kg (m² × 24 h × bar)⁻¹.

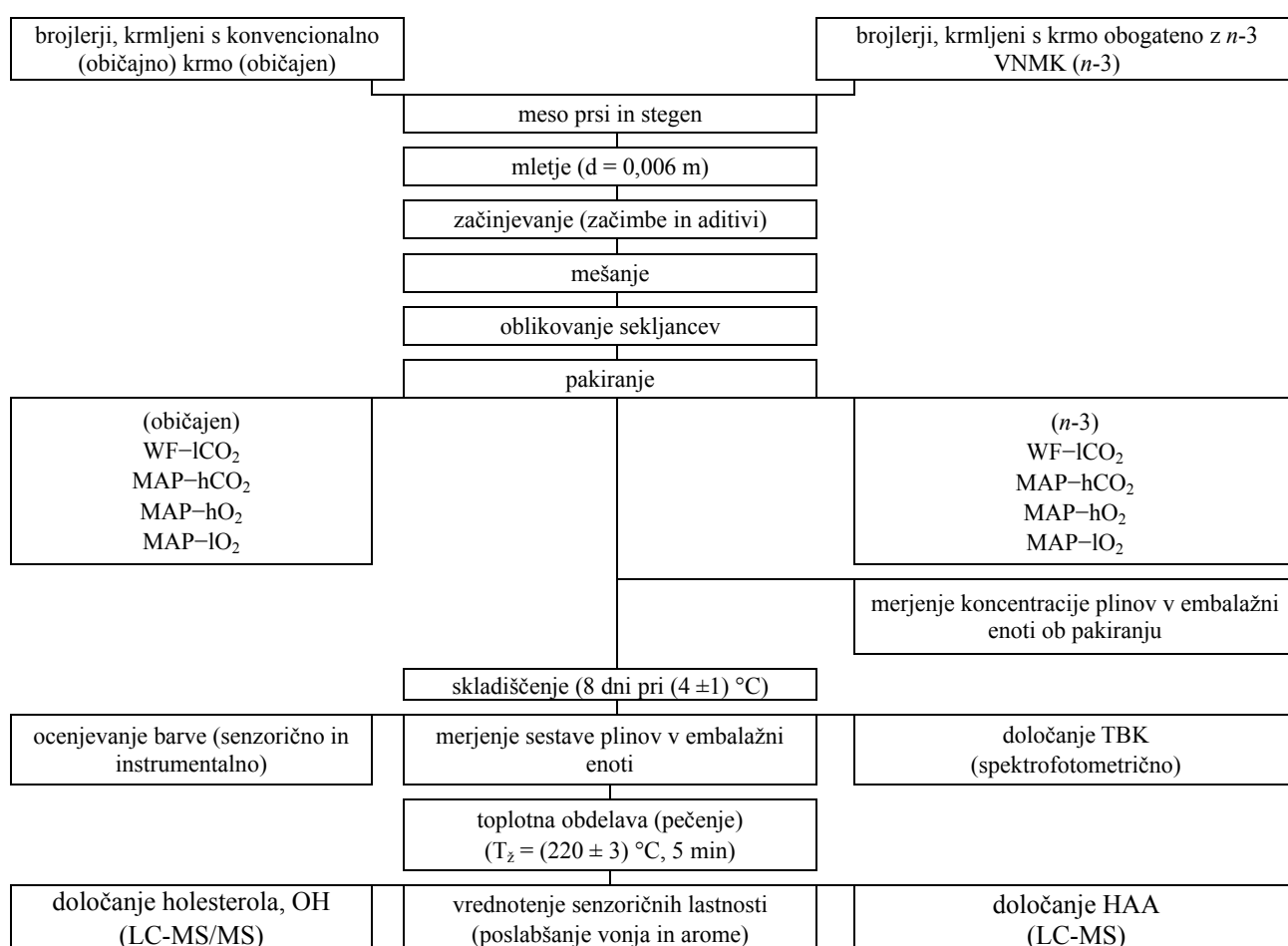
Glede na sestavo plinov (atmosfera) v embalažni enoti ter način pakiranja (zavijanje in modificirana atmosfera) smo definirali štiri podskupine (slika 9):

(i) prva podskupina so bili pladnji s sekljanci, zaviti v večplastno PVC folijo, prepustno za zrak, v katerih je bilo 21 % O₂, <1 % CO₂ in 78 % N₂. Oznaka: WF-ICO₂.

(ii) v podskupini MAP z veliko CO₂ so bili pladnji s sekljanci zavarjeni z zelo visoko barierno prekrivno folijo PP/PE in v katerih je bil zrak zamenjan z modificirano atmosfero, sestavljeno iz 20 % O₂, 30 % CO₂ in 50 % N₂. Oznaka: MAP-hCO₂.

(iii) v podskupini MAP z veliko O₂ so bili pladnji s sekljanci zavarjeni z zelo visoko barierno prekrivno folijo PP/PE in v katerih je bil zrak zamenjan z modificirano atmosfero, sestavljeno iz 80 % O₂ in 20 % CO₂. Oznaka: MAP-hO₂.

(iv) v podskupini MAP z malo O₂ so bili pladnji s sekljanci zavarjeni z zelo visoko barierno prekrivno folijo PP/PE in v katerih je bil zrak zamenjan z modificirano atmosfero, sestavljeno iz <1 % O₂, 25 % CO₂ in 74 % N₂. Oznaka: MAP-IO₂.



Slika 9: Shema postopka izdelave piščančjih sekljancev, obdelave in vzorčenja
Figure 9: Description of the procedures carried out in the present study for the chicken patties production, treatments and sampling

Na omenjene štiri načine smo zapakirali tudi prazne pladnje brez sekljancev, ki so nam služili za merjenje koncentracije plinov ob pakiranju (glej točko 3.2.4.3). Pladnje smo namreč po meritvi morali izločiti zaradi predrtja folije v embalažni enoti.

Pakirane sekljance smo skladiščili 8 dni (predviden rok uporabe) v hladilniku pri temperaturi $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Po skladiščenju smo v embalažnih enotah ponovno izmerili koncentracije plinov (glej točko 3.2.4.3) in na presnih sekljancih senzorično ocenili in instrumentalno izmerili barvo. Sledila je toplotna obdelava – 5-min pečenje na dvoploščnem žaru (Silex, Kitchen Genius 610.95[®], Nemčija) s temperaturo plošč $(220 \pm 3) ^\circ\text{C}$ do končne T_s $(82 \pm 1) ^\circ\text{C}$. T_s smo merili s termometrom (Testo 177-T4), vbodenim v geometrijsko središče sekljancev. Izgube med toplotno obdelavo smo izrazili kot odstotek izgube mase.

3.2 METODE

3.2.1 Sklop I: Karakterizacija rastlinskih ekstraktov

3.2.1.1 Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu (FC)

Princip:

Spektrofotometrična metoda temelji na oksidaciji fenolnih spojin v alkalnem mediju, ki s Folin-Ciocalteu's (FC) reagentom (Merck, 1.09001), ki vsebuje volframat in molibdat, daje modro obarvan kompleks. Obarvanemu produktu izmerimo absorbanco pri 752 nm (spektrofotometer CECIL CE 2021, 2000 series).

Izvedba:

Vzorke za določanje skupnih fenolnih spojin pripravimo tako, da v epruvete s teflonskim pokrovčkom na navoj (Assistent, 976) najprej odpipetiramo 100 µl posameznega etanolnega ekstrakta, ki ga predhodno ustrezno redčimo. Nato v sledečem vrstnem redu dodamo, najprej 100 µl 70 % etanola (Merck, 1.00971), 1200 µl bidestilirane vode in na koncu 100 µl reagenta FC (Folin-Ciocalteus phenol reagent; Merck, 1.09001). Vse skupaj hitro premešamo na vrtničnem mešalu (MS2 Minishaker IKA®, ZDA) in počakamo 5 min. Sledil je dodatek 500 µl 10 % Na₂CO₂ (Merck, 1.06392) in vse skupaj ponovno premešamo ter počakamo 60 min. Po 60 min vzorce prenesemo v kivete in izmerimo absorbanco pri 752 nm (spektrofotometer CECIL CE 2021, 2000 series).

Istočasno pripravimo umeritveno krivuljo, s pomočjo katere lahko na osnovi izmerjene absorbance vzorca določimo koncentracijo skupnih fenolnih spojin izraženo v mg galne kisline na liter ekstrakta. Pri tem moramo upoštevati tudi predhodne redčitve vzorcev.

Izračun:

$$c_{\text{ekstrakt}} (\text{mg l}^{-1}) = \frac{A \times R}{k} \quad \dots (12)$$

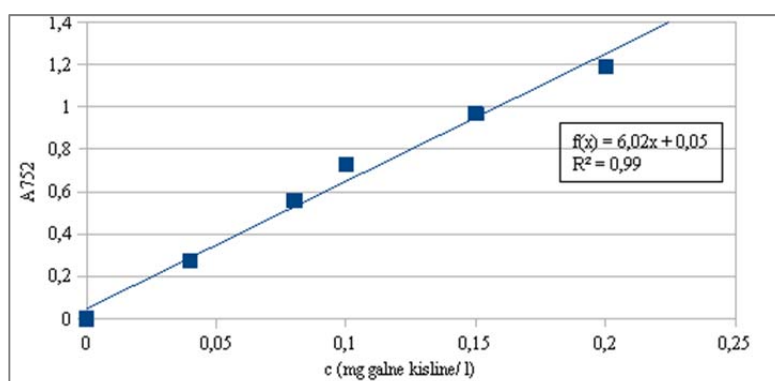
c_{ekstrakt} (mg/l) = koncentracija galne kisline v mg na liter ekstrakta

A_{752} = absorbanca vzorca pri valovni dolžini 752 nm

k = naklon umeritvene krivulje

Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin po metodi FC

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili raztopino galne kisline (Sigma-Aldrich, 398225), ki se uporablja kot standardna raztopina za določanje skupnih fenolnih spojin. Izhodiščno koncentracijo standardne raztopine galne kisline (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich, 39225) smo pripravili tako, da smo v 10 ml bučko zatehtali (tehtnica Scaltec; Sartorius AG Gottinger, Nemčija) 10 mg galne kisline (Sigma-Aldrich, 39225) in s 70 % etanolom (Merck, 1.00971) dopolnili do oznake. Sledila je priprava posameznih redčitev standardne raztopine za pripravo umeritvene krivulje (slika 10). Nadaljnji postopek je enak kot pri vzorcih.



Slika 10: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin
Figure 10: Calibration curve to determine the total phenolic compounds

3.2.1.2 Določanje koncentracije posameznih fenolnih spojin v ekstraktih

Posamezne fenolne spojine smo določali v ekstraktih, katerih priprava je opisana v točki 3.1.1.1. V naslednji fazi smo v 2 ml centrifugirke odpipetirali po 2 ml posameznega ekstrakta in centrifugirali (Eppendorf Centrifuge 5415 D). Po centrifugiranju smo odpipetirali 1 ml supernatanta in mu dodali 3,6 ml destilirane vode. Tako smo dobili ekstrakte s končno vsebnostjo 15 % etanola. Sledilo je čiščenje SPE.

Ekstrakcija s trdno fazo (SPE)

Čiščenje vzorcev (ekstraktov) smo opravili z metodo ekstrakcije s trdno fazo (SPE, iz angl. solid phase extraction). Uporabili smo kolone Strata-X 500 mg (8B-S100-HBJ; Phenomenex). Celoten vzorec smo injicirali na kolono, ki smo jo predhodno kondicionirali z 8 ml acetonitrila (AcN; Fluka, 34967) in uravnotežili z 8 ml 15 % metanola (MeOH; Merck, 1.06007). Čiščenje kolone je potekalo z 8 ml 15 % MeOH (Merck, 1.06007) v destilirani vodi. Na sorbent ujete polifenole smo eluirali z 8 ml AcN (Fluka, 34967). Dobljene vzorce smo nato do suhega evaporirali v zmernem toku dušika ter končni ekstrakt tik pred določevanjem na LC-MS sistemu raztopili v 1 ml MeOH (Merck, 1.06007) in vse skupaj prenesli v vialo.

Določanje polifenolnih spojin z LC-MS

Vzorci smo analizirali s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS) in uporabili sistem HPLC Agilent Technology 1100 (komponente aparature: glej pod točko 3.2.2.2).

Kromatografski pogoji:

- način kromatografije: RP (reverzna faza)
- kromatografska kolona Kinetex C18 (2,6 μm \times 2,1 \times 100 mm) (Phenomenex, Torrance, ZDA, 00F-4439-B0),
- mobilna faza A: 0,1 % HCOOH v vodi,
- mobilna faza B: acetonitril (AcN),
- volumen injiciranja: 10 μl ,
- temperatura vzorcev: 8 $^{\circ}\text{C}$,
- temperatura kolone: 30 $^{\circ}\text{C}$.

Preglednica 6: Kromatografski pogoji (gradienti mobilne faze) pri določanju fenolnih spojin

Table 6: Chromatography conditions (mobile phase gradient) to determine phenolics compounds

Čas (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)	Pretok (ml/min)
0,00	97	3	0,300
2,00	97	3	0,300
20,00	40	60	0,300
21,00	0	100	0,300
25,00	0	100	0,300
26,00	97	3	0,300
35,00	97	3	0,300

Za detekcijo fenolnih spojin v etanolnih ekstraktih smo uporabili masni detektor Micromass Quattro Micro (Waters, Milford, MA, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (Electrospray Ionization - ESI), ki je deloval pri naslednjih pogojih:

- napetost kapilare 3,5 kV v pozitivnem načinu ionizacije (ESI+),
- napetost vhodne leče: 22 V,
- ekstraktor: 2 V,
- temperatura vhodne leče: 120 °C,
- temperatura razpršilnega N₂: 350 °C,
- pretok N₂ vhodne leče: 50 l/h,
- pretok razpršilnega N₂: 400 l/h,
- način detekcije: SIR način (Selected Ion Recording).

Detekcija na masnem spektrometru je potekala v SIR načinu pri pogojih, ki so navedeni v preglednici 7.

Preglednica 7: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR načinu

Table 7: Terms of detection in the mass spectrometer in SIR mode

Fenolna spojina	m/z (ESI+)	cona (V)	fenolna spojina	m/z (ESI+)	cona (V)
salicilna kislina	137,10	22	elaginska kislina	301,09	22
vanilin	151,10	22	kvercetin	301,09	22
propokatehnična kislina	153,12	22	taksifolin	303,25	22
p-kumarna kislina	163,05	22	galaktokatehin	305,21	22
galna kislina	169,05	22	klorogenska kislina	353,18	22
apigenin	169,20	22	rožmarinska kislina	359,31	22
kavna kislina	179,20	22	hipolaetin-7-pentozid	431,22	22
siringična kislina	197,15	22	apigenin-7-glukozid	431,38	22
galangin	269,20	22	luteolin-3-glukoronid	447,38	22
naringerin	271,19	22	astilbin	449,39	22
luteolin	285,18	22	kupresoflavon	537,39	22
katehin	289,17	22	rutin	609,25	22
epikatehin	289,17	22	hesperidin	609,56	22

Rezultati so bili obdelani s funkcijo Quantify v računalniškem programu MassLynx™ V4.1 (Micromass, 2004).

3.2.1.3 Določanje citotoksičnosti in genotoksičnosti etanolnih rastlinskih ekstraktov

S testoma MTS in MTT celicah celične linije HepG2 smo določali morebitno citotoksično delovanje različnih etanolnih ekstraktov, medtem ko smo s testom komet določali njihovo genotoksičnost. Testirali smo izbrane etanolne rastlinske ekstrakte (preglednica 4), ki smo jih predhodno pripravili po postopku, ki je opisan pod točko 3.1.1.1 in jih do testiranja hranili v hladilniku (Gorenje, Slovenija) pri temperaturi $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Vse teste za določanje citotoksičnosti in genotoksičnosti rastlinskih ekstraktov smo izvedli na Nacionalnem inštitutu za biologijo, oddelek za gentsko toksikologijo in biologijo raka pod vodstvom doc. dr. Bojane Žegura.

Za preučevanje citotoksičnosti in genotoksičnosti določenih snovi se uporabljajo t.i. biološki testi. Pri tem žive organizme ali celice izpostavimo testnim snovem in spremljamo njihov odziv. Uporabljajo se organizmi oz. celični sistemi, kjer v kratkem času dobimo več generacij iz velike populacije posameznih celic, kar je predpogoj, da lahko spremljamo povečano pogostost genetskih sprememb. V primerjavi z živalskimi testi so ti mnogo enostavnejši in hitrejši (Filipič, 2004). Kot citotoksičen učinek se pri večini standardnih bioloških testih upošteva 50 % smrtnost, negibnost ali inhibicija rasti (Dizer in sod., 2002). Osnovna predpostavka testov genotoksičnosti je, da je osnova dednega materiala enaka pri vseh živih bitjih. Omejitev uporabe bioloških testov je ta, da ne pokaže, katera oz. katere spojine preiskovane snovi so odgovorne za učinek na testni organizem (Filipič, 2004).

Za preučevanje citotoksičnosti vzorcev etanolnih rastlinskih ekstraktov smo uporabili testa MTT in MTS, s katerimi spremljamo aktivnost mitohondrijskih sukcinat dehidrogenaz. Spadata med kolorimetrične teste, ki temeljijo na pretvorbi brezbarvnega substrata v barvni produkt v prisotnosti živih celic (Mosmann, 1983). Za preučevanje genotoksičnosti z biološkimi testi pa smo uporabili alkalno različico testa komet, uporabljajo pa se še razni drugi testi, kot npr. Amesov test, test mikrojedr itd. (Maron in Ames, 1984; Singh in sod., 1988; Uhl in sod., 1999; Fenech, 2006).

Princip testa MTT in MTS:

Test MTT je enostavna, natančna in kvantitativna kolorimetrična metoda za določanje števila celic, ki ga je opisal Mossman (1983). Uporabljamo ga za določanje citotoksičnosti snovi in vpliva teh snovi na celično proliferacijo. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid (MTT) je rumena vodotopna substanca, ki jo mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza metabolno aktivnih celic reducira v vijoličaste v vodi netopne kristale formazana. Kristali formazana so topni v dimetil sulfoksidu (DMSO), izopropanolu in podobnih organskih topilih. Količina nastalih formazanskih kristalov oz. izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 570 nm (referenčna valovna dolžina je 690 nm) je sorazmerna številu živih celic. Prednost je metode je predvsem hitrost, saj rezultate lahko odčitamo zelo hitro po dodatku topila (DSMO), v katerem se formazan raztaplja. Slaba stran te metode pa je v tem, da ne določamo direktno števila celic, temveč preko aktivnosti predpostavljamo, koliko je živih celic (Mosmann, 1983).

Pri testu MTS se 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolim (MTS) prav tako pod vplivom delovanja mitohondrijskih dehidrogenaznih encimov, ki so aktivni le v živih celicah, pretvori v vodotopni formazan ob prisotnosti PMS (fenazin metasulfat). Količino nastalega formazana določimo spektrofotometrično in

izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 515 nm je proporcionalna številu živih celic v merjeni kulturi. Test MTS je prav tako kot test MTT kvantitativna kolorimetrična metoda za določanje proliferacije in viabilnosti celic.

Prednost testa MTS v primerjavi s testom MTT je v tem, da pri MTS raztapljanje nastalih kristalov ni potrebno, ker je MTS-formazan vodotopen, tako da testiranje poteka brez spiranja ali žetve celic. Izognemo se uporabi strupenih organskih topil (npr. DMSO).

Izvedba testiranja citotoksičnosti:

Celice HepG2, ki smo jih predhodno gojili po postopku, ki je opisan pod točko 1.6.1.3, smo nato presadili na mikrotitrne plošče s 96 luknjicami (Nunc, ZDA) z gostoto 8.000 celic/luknjico v petih paralelkah. Luknjice mikrotitrne plošče (Nunc, ZDA) smo polnili naključno z 200 μ l celične suspenzije/luknjico. Nasajene plošče smo nato inkubirali 24 h v inkubatorju (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija) pri 37 °C in 5 % CO₂. Po pritrditvi (naslednji dan) smo celicam odstranili izrabljeno (staro) gojišče in ga zamenjali z 200 μ l svežega gojišča z dodanimi izbranimi etanolnimi ekstrakti (postopek priprave opisan v točki 1.6.1.1). Celice smo tako tretirali z 1 % raztopinami posameznega etanolnega ekstrakta (preglednica 4), ki smo jih predhodno pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirke (Plastibrand, Nemčija) odpipetirali 10 μ l posameznega etanolnega ekstrakta in dodali 990 μ l medija. Pri poskusu smo naredili tudi negativno kontrolo (gojišče) in kontrolo topila (zmešamo 10 μ l 70 % etanola (Merck, 1.00971) in 990 μ l medija). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili etoposid (Santa Cruz Biotechnology, ZDA, sc-3512A) (končna koncentracija 30 μ g/ml). Tako tretirane celice smo inkubirali 21 h pri 37 °C in 5 % CO₂.

Pri testu MTS smo celicam po 21-urni inkubaciji dodali predhodno pripravljeno mešanico MTS (Promega, G1111) in PMS (fenazin metasulfat; Sigma-Aldrich, P9625-500MG) (razmerje 20:1; 2 ml MTS in 100 μ l PMS) v razmerju 1:5 (v vsako luknjico dodamo 40 μ l mešanice), medtem ko smo pri testu MTT celicam po inkubaciji dodali reagent MTT (Sigma, M-5655) (končna koncentracija 0,5 mg/ml). Pri obeh testih je nato sledila nadaljnja 3-urna inkubacija (skupaj je čas inkubacije 24 h). V primeru testa MTS smo nato, po končani inkubaciji, lahko direktno izmerili absorbanco pri valovni dolžini 515 nm s pomočjo spektrofleurimetra (Tecan, Avstrija). Nasprotno pa smo pri testu MTT po inkubaciji najprej odstranili gojišče z reagentom MTT in nato dodali 200 μ l dimetilsulfoksida (DMSO) (Sigma, 154938-IL), ki raztaplja kristale formazana. Sledilo je merjenje absorbance pri valovni dolžini 570 nm (z referenčno valovno dolžino pri 690 nm).

Izmerjena absorbanca je proporcionalna številu živih celic v merjeni kulturi. Relativno preživelost smo določali s primerjavo povprečne absorbance pri izpostavljenih celicah in kontroli topila. Preverili smo tudi ali se kontrola topila značilno razlikuje kontrole. Rezultati so pokazali, da se kontrola topila statistično ne razlikuje od kontrole gojišča. Rezultate smo statistično obdelali s programom GraphPad Prism z enosmerno analizo variance (ANOVA), kjer smo analizirali razlike med izpostavljenimi in kontrolnimi celicami (Dunnett post test, $p < 0,05$).

Princip testa komet na celicah HepG2:

Test komet ali elektroforeza posamezne celice je preprosta in zelo občutljiva metoda, ki sta jo leta 1984 razvila Östling in Johanson (Östling in Johanson, 1984). Celice pomešane z agarozo sta izpostavila elektroforezi pri nevtralnih pogojih, kar je omogočilo zaznavanje

prelomov obeh verig DNK. Metoda je nato doživela številne modifikacije in eno izmed teh so leta 1988 opravili Singh in sod., ki so pri testu uporabili alkalne pogoje ($\text{pH} > 13$). To je poleg zaznavanja prelomov obeh verig (DSB, iz angl. double strand breaks) omogočilo tudi zaznavanje preloma ene verige DNK (SSB, iz angl. single-strand breaks), prelomov zaradi alkalno labilnih mest in prelomov DNK (ALS, iz angl. alkali labile sites), ki nastanejo kot vmesna stopnja v procesu popravljanja poškodb DNK z izrezovanjem baz in nukleotidov (Singh in sod., 1988; Tice in sod., 2000).

Test komet je zasnovan na dejstvu, da DNK z več prelomi potuje hitreje v električnem polju, kar po elektroforezi in barvanju z barvili, ki se vežejo na DNK, vidimo kot rep komet. Pri različici testa komet, ki se danes večinoma uporablja, celice po izpostavitvi testnim snovem najprej imobiliziramo v agaroznem gelu. Celice nato liziramo z detergentom pri $\text{pH} 10$ in DNK odvijamo in potem izpostavimo elektroforezi za kratek čas pri alkalnih pogojih ($\text{pH} > 13$). Med lizo se razgradijo vse celične komponente, ostane samo jedro s superzavito DNK s histoni. Fazi liziranja sledi inkubacija v alkalnih pogojih ($\text{pH} > 13$), pri čemer se DNK začne odvijati na mestih prelomov verig – izrazijo se enoverižni prelomi. Po alkalnem odvijanju sledi elektroforeza pri velikem pH . Nepoškodovana DNK je zvrta in ne potuje v električnem polju, zato pri kontrolnih celicah ne opazimo značilnega repa komet. Pri močno poškodovani (prelomljeni) DNK pa fragmenti negativno nabite DNK prosto in hitreje potujejo v električnem polju proti anodi ter ustvarijo značilen rep komet, ki ga zaznamo s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa, potem ko smo jedra obarvali s fluorescenčnimi barvili, ki se vrinejo med bazne pare DNK (npr. etidijev bromid). Njegova dolžina se povečuje s številom poškodb.

Če s testom komet zaznamo veliko poškodb DNK, to lahko pomeni, da je DNK zelo poškodovana ali pa je to posledica učinkovitega popravljanja poškodb DNK (Collins in sod., 1997). Pomanjkljivost metode je, da ne moremo natančno določiti narave poškodbe, ki jo zaznamo s tem testom (Horváthová in sod., 1998).

V primerjavi z drugimi testi za ugotavljanje genotoksičnosti so prednosti testa komet predvsem v veliki občutljivosti, kar je pomembno pri ugotavljanju majhnega števila poškodb DNK, fleksibilnosti, enostavnosti, relativno majhni količini testirane snovi in kratkem času potrebnem za izvedbo testa (Tice in sod., 2000)

Pri $\text{pH} 12,6$ in višjem se ALS hitro spremenijo v SSB. Ker večina genotoksičnih snovi inducira večje število SSB kot ALS in DSB, se alkalna različica testa komet priporoča kot optimalna za ugotavljanje genotoksičnosti (Tice in sod., 2000).

Izvedba testa komet:

Celice HepG2 smo predhodno gojili v plastenkah za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm^2 (Costar, Corning Corporation, ZDA) po postopku, ki je opisan v točki 3.1.1.3. Nato smo celice poželi in jih nasadili na plošče z 12 luknjicami (Costar 3513, Corning Corporation, ZDA) z gostoto 70.000 celic/luknjico ter jih pustili čez noč, da so se pritrdile. Naslednji dan smo celice izpostavili izbranim etanolnim ekstraktom. Pri tem smo star medij zamenjali z 1 % raztopino posameznega ekstrakta (pripravimo tako kot pri testu MTS in MTT). Sledila je 24-urna inkubacija izpostavljenih celic. Enako kot pri testih MTS in MTT smo tudi tu naredili negativno kontrolo (gojišče) in kontrolo topila (etanol (Merck, 1.00971)). Kot pozitivno kontrolo smo pri tem testu uporabili znan genotoksičen agens benzo(a)piren

(B(a)P) s 30 μ M koncentracijo. Po končani inkubaciji smo celice poželi. Celicam smo odstranili medij, jih sprali z 1 ml 1x PBS (iz 10x PBS, PAA, H15-011) in tripsinizirali z 200 μ l 0,1 % tripsina (sestavo glej v Prilogi E). Sledila je 3- do 5-min inkubacija in, ko so se celice odlepili od podlage, smo v vsako luknjico dodali 800 μ l svežega gojišča, vse skupaj prenesli v mikrocentrifugirke (Plastibrand, Nemčija) ter centrifugirali 5 min pri 800 obratih/min (centrifuga Minispin, Eppendorf). Po končanem centrifugiranju smo celicam odstranili supernatant in jih resuspendirali v 60 μ l svežega gojišča. Med tem smo na posušena objektna stekelca peskana po celotni površini, ki smo jih pred uporabo čez noč namočili v absolutnem metanolu (Sigma, M1775-1GA), da smo jih razmastili, najprej nanесли 80 μ l 1 % agaroze z normalno temperaturo taljenja (NMP agarosa, iz angl. normal melting point agarose) (Invitrogen, 16500-100) raztopljene v 1x PBS (iz 10x PBS, PAA, H15-011) in pokrili s krovnim stekelcem. Stekelca smo za 5 min postavili v hladilnik na $((4 \pm 1) ^\circ\text{C})$, da se je agarosa strdila. Nato smo previdno odstranili krovna stekelca in na NMP agaroso nanесли 70 μ l mešanice (30 μ l celične suspenzije pomešane s 70 μ l 1 % agaroze z nizko točko taljenja (LMP agarosa, iz angl. low melting point agarose) (Invitrogen, 15517-022)), spet pokrili s krovnim stekelcem in inkubirali 5 min v hladilniku $((4 \pm 1) ^\circ\text{C})$, da se je zgornja plast agaroze strdila. Vse nadaljnji koraki in faze inkubacije so potekale v temi in v hladilniku $((4 \pm 1) ^\circ\text{C})$, da smo se izognili nespecifičnim poškodbam DNK. Najprej smo izvedli t.i. alkalno lizo celic. Ko se je agarosa strdila, smo objektnim stekelcem najprej previdno odstranili krovnike in jih položili v kadičko s sveže pripravljeno hladno raztopino za alkalno lizo s pH 10 ter inkubirali 1 h. Zaradi velikega pH se v tej fazi razgradijo proteini in RNK, detergenti pa razgradijo celične membrane. Po končani inkubaciji oz. liziranju smo objektna stekelca prestavili v elektroforetsko kadičko, ki smo jo napolnili s sveže pripravljenim hladnim pufrom za elektroforezo s pH 13 in inkubirali 20 min, da je poteklo alkalno odvijanje (denaturacija) DNK. Temu je sledila elektroforeza. Jedra celic oz. DNK smo izpostavili električnemu polju pri napetosti 25 V (0,5-1 V/cm). Tok 300 mA smo uravnavali z gladino elektroforetskega pufr. Po končani elektroforezi (po 20 min) smo stekelca prestavili v kadičko s sveže pripravljenim hladnim pufrom za nevtralizacijo s pH 7,5 ter inkubirali nadaljnjih 15 min. Nato smo objektna stekelca pobrali iz pufr. za nevtralizacijo, ji rahlo popivnali ter položili v plastično kadičko, obloženo z navlaženim papirjem, da se geli med hranjenjem ne bi izsušili. Stekelca v tej kadički hranimo do mikroskopiranja v temi in v hladilniku $((4 \pm 1) ^\circ\text{C})$. Sestava in priprava vseh raztopin in pufr. za izvedbo testa komet je navedena v Prilogi E. Pred samim mikroskopiranjem smo gele na objektnih stekelcih barvali z etidijevim bromidom (EtBr; Gibco BRL, 15585-011) raztopljenim v destilirani vodi (5 mg/ml). Komete smo opazovali z mikroskopom (Nikon Eclipse E800, Japonska) s fluorescenčno svetlobo pri 400-kratni povečavi. S pomočjo kamere (Marlin F046B, Allied, Vision Technologies, Združeno kraljestvo) smo zajeli slike jeder in jih analizirali s programom Comet IV (Perceptive Instruments, Združeno kraljestvo). Za statistično analizo smo izbrali odstotek (%) DNK v repu kometa. V vsakem vzorcu smo analizirali 50 jeder, test pa ponovili v treh neodvisnih poskusih. Rezultate smo statistično ovrednotili s programom GraphPrism Pad z enosmerno analizo variance (ANOVA), kjer smo analizirali razlike med kontrolo in izpostavljenimi celicami (Dunnett post test, $p < 0,05$).

3.2.2 Sklop II: Vezava rastlinskih ekstraktov na različne nosilce in njihov vpliv na tvorbo HAA v piščančjih sekljancih, obogatenih z *n*-3 VNMK

V sklopu II smo v okviru predposkusa opravili analizo maščobnokislinske sestave piščančjega fileja (običajen, *n*-3-obogaten), pri čemer se dobljeni rezultati nanašajo tudi na ostale sklope, kjer je bil piščančji file uporabljen. V okviru predposkusa smo opravili tudi vrednotenje senzoričnih lastnosti ter določili vsebnost HAA v piščančjem fileju.

V glavnem poskusu sklopa II smo določali vsebnost HAA v piščančjih sekljancih (z dodanimi različnimi ekstrakti) po enaki metodi kot v predposkusu.

Postopek vezave ekstraktov na nosilce in priprava sekljancev sta opisana v točkah 3.1.2.3. in 3.1.2.4.

3.2.2.1 Določanje maščobnokislinske sestave

Maščobnokislinske (MK) sestave nismo določali na vseh vzorcih, ampak smo iz vsake skupine (običajen, *n*-3) odvzeli po tri piščančje fileje. Fileje iz posamezne skupine smo združili v en vzorec in homogenizirali v mlinu (Grindomix GM 200, Retsch, Nemčija). Analizo za posamezen vzorec (običajen, *n*-3-obogaten) smo izvedli v dveh paralelkah.

MK sestavo piščančjega fileja smo določili z metodo, modificirano po Parku in Goinsu (1994) ter objavljeno v Polak in sod. (2008). Za to analizo smo najprej pripravili metilne estre maščobnih kislin (MEMK), ki so bolj hlapni in bolj nepolarni kot MK. Pri postopku priprave MEMK smo v eni fazi izvedli ekstrakcijo in transesterifikacijo (*in situ* transesterifikacija). MK sestavo smo določili s plinsko kromatografijo (GC).

3.2.2.2 Določanje vsebnosti heterocikličnih aromatskih aminov (HAA)

Heterociklične aromatske amine (HAA) smo ekstrahirali z ekstrakcijo s trdno fazo (SPE) in jih določili s LC-MS v kombinaciji z masnim spektrometrom. Dobljene kromatograme smo obdelali z računalniškim programom MassLynx™ V4.1 (MassLynx™ Version 4.1 SP4, 2004). Za določanje vsebnosti HAA smo uporabili modificirano metodo, ki jo opisujejo Messner in Murkovic (2004) ter Sentellas in sod. (2004).

V sklopu II smo vsebnost HAA določali v vzorcih skorje piščančjih filejev po toplotni obdelavi (pripravljeni po postopku opisanem v točki 3.1.2.2.) in vzorcih toplotno obdelanih piščančjih sekljancev, ki so bili pripravljene po postopku opisanem v točki 3.1.2.4. Pri piščančjih filejih smo rezultate izrazili v µg HAA/kg površinske skorje fileja, v primeru sekljancev pa smo rezultate izrazili v µg HAA/kg sekljanca.

Priprava

V 100 ml čaše smo odtehtali 3,000 g homogeniziranega vzorca (skorja fileja oz. skorja in sredica sekljanca; debelina skorje: 2 mm) in dodali 100 µl raztopine internega standarda (0,632 µg/g) TriMeIQx (TRC, A630000) v metanolu ter 12 ml 1 M raztopine NaOH (Merck, 1.06498). Čase smo pokrili s parafilmom in vse skupaj za 12 h postavili na magnetni mešalnik (Variomac Electronicrührer MULTIPOINT HP1S, Nemčija) ter suspenzijo mešali pri sobni temperaturi in 500 obratih/min.

Ekstrakcija HAA

V alkalni homogenat smo vmešali 13 g diatomejske zemlje – Extrelut[®] NT (Merck, 1.15092.1000) in z zmesjo napolnili stekleno kolono (Lenz, 5.4508.04). HAA smo ekstrahirali s 70 ml ekstrakcijskega topila etilacetata (Sigma-Aldrich, 34858-252) in eluat lovili v čašo. Sledilo je čiščenje eluata z metodo ekstrakcijo s trdno fazo (SPE, iz angl. solid phase extraction). Uporabili smo kolonice (angl. Cartridge) Oasis MCX 3cc 60 mg (iz angl. Mixed Mode Cation Exchanger) (LP Extraction Cartridges, cat: 186000253, Waters, Ireland). Ves eluat smo injicirali na MCX sorbent, ki smo ga predhodno kondicionirali z 2 ml metanola (Merck, 1.06007.2500) in uravnotežili z 2 ml zmesi topil etilacetata (Sigma-Aldrich, 34858-252) in diklorometana (Merck, 1.06044.2500) v razmerju 1:1. Čiščenje je potekalo z 2 ml 0,1 M raztopine HCl (Merck, 1.09060.1000) in z 2 ml metanola (Merck, 1.06007.2500). Na MCX sorbent ujete polarne in nepolarne HAA smo eluirali z 2 ml zmesi topil metanola (Merck, 1.06007.2500) in 25 % amoniaka (NH₃; Merck, 1.05432.1000), ki smo ju zmešali v razmerju 19:1 (v/v). Dobljene vzorce smo nato do suhega evaporirali v zmernem toku dušika ter končni ekstrakt tik pred ločevanjem na LC-MS sistemu raztopili v 250 µl metanola (Merck, 1.06007.2500).

Analiza vzorcev je bila opravljena na sistemu Agilent 1100, ki ga sestavljajo:

- vakuumski razplinjevalnik: G1379A,
- binarna črpalka: G1312A,
- avtomatski vzorčevalnik: G1330B,
- termostat kolone: G1316A,
- DAD detektor: G1315B.

Kromatografski pogoji:

- način kromatografije: RP (reverzna faza),
- kromatografska kolona Kinetex C18 (2,6 µm × 2,1 × 100 mm) (Phenomenex, Torrance, ZDA, 00F-4439-B0),
- mobilna faza A: 30 mM amonijev formiat (HCOOHNH₄; Fluka, 09739; pH 3,2),
- mobilna faza B: acetonitril (AcN; Merck, 1.00030),
- volumen injiciranja: 1 µl,
- temperatura vzorcev: 8 °C,
- temperatura kolone: 30 °C.

Preglednica 8: Kromatografski pogoji (gradienti mobilne faze) pri določanju HAA

Table 8: Chromatography conditions (mobile phase gradient) to determine HCA

Čas (min)	mobilna faza A (%)	mobilna faza B (%)	pretok (ml/min)
0,00	95	5	0,350
14,00	40	60	0,350
14,50	0	100	0,350
17,00	0	100	0,350
20,00	95	5	0,350
26,00	95	5	0,350

Posamezni HAA so bili določeni na podlagi retencijskih časov in m/z HAA standardov (TRC: harman, H105000; norharman, N700000; IQ, H785000; MeIQ, A605200; IQ_x, A616900; MeIQ_x, A606600; 4,8-DiMeIQ_x, A631000; 7,8-DiMeIQ_x, A869500; 4,7,8-

TriMeIQx, A630000; PhIP, A617000, AαC, A629002; Glu-P-2, N493810; Trp-P-1, N493780; Trp-P-2, N493985).

Pogoji detekcije:

Za detekcijo HAA smo uporabili masni detektor Micromass Quattro micro[®] API (Waters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (Electrospray Ionization – ESI), ki je deloval pri naslednjih pogojih:

- napetost kapilare 3,5 kV v pozitivnem načinu ionizacije (ESI+),
- napetost vhodne leče: 40 V,
- ekstraktor: 2 V,
- temperatura vhodne leče: 120 °C,
- temperatura razpršilnega N₂: 350 °C,
- pretok N₂ vhodne leče: 50 l/h,
- pretok razpršilnega N₂: 350 l/h,
- način detekcije: SIR način.

Detekcija na masnem spektrometru je potekala v SIR načinu pri pogojih, ki so navedeni v preglednici 9.

Preglednica 9: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR načinu

Table 9: Terms of detection in the mass spectrometer in SIR mode

HAA	m/z (ESI+)Cona (V)	
IQ	199,20	40
IQx	200,20	40
MeIQ	213,20	40
MeIQx	214,20	40
4,8-DiMeIQx	228,20	40
7,8-DiMeIQx	228,20	40
Glu-P-2	185,20	40
Trp-P-1	221,20	40
Trp-P-2	198,20	40
AαC	184,20	40
harman	183,28	40
norhrman	169,26	40
PhIP	225,20	40
TriMeIQx	242,26	40

Rezultati so bili obdelani s funkcijo Quantify v računalniškem programu MassLynxTM V4.1 (Micromass, 2004).

3.2.2.3 Vrednotenje senzoričnih lastnosti piščančjih filejev obdelanih z različnimi postopki toplotne obdelave

Namen senzoričnega ocenjevanja v sklopu II (predposkus) je bil ovrednotiti vpliv obogatitve piščančjega mesa z *n*-3 ter načina toplotne obdelave in stopnje pečenosti na senzorične lastnosti. Z namenom opredelitve senzoričnih lastnosti smo sestavili senzorični panel štirih preskuševalcev, ki dobro poznajo področje ocenjevanja mesnih izdelkov. Panel so ves čas sestavljali isti preskuševalci. Senzorična analiza je bila opravljena v senzoričnem laboratoriju Katedre za tehnologijo mesa in vrednotenje živil na Oddelku za živilstvo.

Panel je ocenjeval vzorce enega po enega v skupinah glede na način toplotne obdelave. Premor med skupinami bil 30 min. Za senzorično oceno smo takoj po toplotni pripravi od posameznega vzorca fileja odrezali 1 cm debelo rezino in jo ponudili preskuševalcem v oceno na belih krožnikih. Krožnike smo opremili s številko in na ta način zagotovili anonimnost vzorcev. Za nevtralizacijo okusa je imela komisija na razpolago sredico belega kruha in mlačno vodo z okusom limone (1 %). Preskuševalci smo uporabili metodo kvantitativne deskriptivne analize z nestrukturirano lestvico (1-4-7) (Golob in sod., 2006). Pri tem sistemu vrednost 1 pomeni, da lastnost ni izražena, ali je popolnoma nesprejemljiva, vrednost 4 pomeni optimalno ali srednje izraženo lastnost in vrednost 7 pomeni, da je lastnost močno izražena ali odlično izražena. Panel je lahko uporabljal tudi polovične vrednosti točk (0,5, 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5 in 6,5).

Merila za ocenjevanje posameznih lastnosti so bila:

Obarvanje piščančjih filejev po toplotni obdelavi:

- 1 – slabo izražena barva po pečenju
- 4 – optimalno zapečena, nežno rjava barva površine mesa
- 7 – močno izražena rjava barva površine mesa (zažgano)

Tekstura:

- 1 – izrazito premehka tekstura
- 4 – optimalna tekstura mesa
- 7 – izrazito čvrsta tekstura mesa (izrazito suha tekstura)

Tuji vonji:

- 1 – ni tujih vonjev
- 7 – tuji vonji so močno izraziti

Tuje arome:

- 1 – ni tujih arom
- 7 – tuje arome so močno izrazite

3.2.2.4 Statistična obdelava podatkov za sklop II

Rezultate, pridobljene iz analiz, smo pripravili in uredili s programom Microsoft Excel 2007. Osnovne statistične parametre smo izračunali s postopkom MEANS, s postopkom UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve (SAS Software, 1999). Analiza podatkov je bila izvedena s programsko opremo Statistical Analysis System (SAS) software, version 8.1 (SAS Institute, Cary, NC, ZDA).

Za analizo vpliva dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3–obogatitev) na maščobnokislinski profil piščančjih filejev smo uporabili statistični model, v katerega smo vključili fiksen vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (običajno in *n*-3–obogateno meso) in ponovitve (2).

Eksperiment za vrednotenje nastanka HAA in senzoričnih lastnosti piščančjih filejev v predposkusu je bil zastavljen kot faktorski poskus $2 \times 6 \times 2$ (2 tipa piščančjega mesa (običajni in *n*-3 sekljanci), 6 skupin glede na način toplotne obdelave/dosežene središčne

temperature (t.j. IR/82 °C, IR/95 °C, pečica/82 °C, pečica/95 °C, žar/82 °C, žar/95 °C) in 2 ponovitvi). Interakcija tip piščančjega mesa × način toplotne obdelave/dosežene središčne temperature ni bila statistično značilna ($p > 0,05$), zato v model ni bila vključena.

Eksperiment za vrednotenje nastanka HAA v različno mariniranih piščančjih sekljancih je bil zastavljen kot faktorski poskus $2 \times 14 \times 2$ (2 tipa piščančjega mesa (običajni in n -3 sekljanci), 14 skupin glede na rastlinski ekstrakt (t.j. kontrola, BR1, BR2, BR3, LB1, LB2, LB3, LB4, LB5, LB6, ROŽ1, ROŽ2, ROŽ3, ROŽ4) in 2 različna nosilca (t.j. škrob in sol)). Pričakovane povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane s testom LSM in primerjane pri 5 % tveganju.

3.2.3 Sklop III: Marinade z ekstraktom brinovih jagod in njihov vpliv na tvorbo produktov oksidacije in HAA v piščančjih mini filejih, obogatenih z n -3 VNMK

V sklopu III smo marinirali piščančje mini fileje v marinadah z dodanim ekstraktom brinovih jagod in ugotavljali vpliv le-teh na barvo in oksidativno stabilnost mesa (število TBK, OH) med skladiščenjem ter na tvorbo HAA po toplotni obdelavi po različnem času skladiščenja.

3.2.3.1 Instrumentalno merjenje barve

Ob vsakem vzorčenju (1., 5. in 9. dan) smo embalažne enote odprli in na več mestih mini filejev pomerili barvo. Barvo mini filejev smo izmerili s kromametrom Minolta CR 400 (Minolta, Japonska). Pred samo uporabo smo aparat umerili na beli standardni keramični ploščici ($Y = 93,8$, $x = 0,3134$, $y = 0,3208$). Izmerjeno barvo nam je aparat podajal v treh CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*) vrednostih L^* (svetlost), a^* (\pm , rdeča do zelena) in b^* (\pm , rumena do modra). Na enem mini fileju smo izmerili barvo na štirih različnih mestih, t.j. v štirih paralelkah. Dobljene vrednosti smo uporabili za izračun razlike v svetlosti (ΔL^*) in nasičenosti (ΔC^*) barve (Moore, 1998) po naslednjih enačbah:

$$\Delta L^* = L^*_{\text{ref}} - L^* \quad \dots (13)$$

$$\Delta C^* = ([a^*]^2 + [b^*]^2)^{0,5} - ([a^*_{\text{ref}}]^2 + [b^*_{\text{ref}}]^2)^{0,5} \quad \dots (14)$$

Kot referenco za izračun smo uporabili barvne vrednosti izmerjene na sekljancih MAP-hCO₂ iz običajnega mesa. Vrednosti ΔL^* in ΔC^* nismo statistično obdelali.

Barvni prostor L^* , a^* , b^* je definiran kot sistem z enakimi prostorskimi razmiki (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007). Barvna vrednost L^* podaja svetlost barve vzorcev in zajema vrednosti od 0 do 100 (večja vrednost pomeni svetlejšo barvo – gre proti beli). Ostali dve komponenti pa služita za določanje lege v barvnem prostoru. Koordinata a^* določa lego na rdeče-zeleni osi, pri čemer pozitivna vrednost pomeni rdečo barvo, negativna vrednost pa bolj zelenkasto barvo. Kot zadnji parameter pri merjenju barve nam kromometer podal vrednost b^* , ki določa položaj barve na modro-rumeni osi (pozitivna vrednost predstavlja intenziteto rumene barve, negativna pa modre).

3.2.3.2 Število tiobarbiturne kisline (TBK)

Test s tiobarbiturno kislino (TBK) uporabljamo za ugotavljanje oksidativnega kvara – žarkosti maščob in živil, ki vsebujejo maščobe. Osnova temu testu je oblikovanje rdečega

pigmenta, ki nastane pri reakciji med malondialdehidom, kot produktom oksidacije VNMK, in tiobarbiturno kislino med segrevanjem. Nastali pigment kaže značilni absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 532 nm.

Za določanje števila TBK smo uporabili modificirano ekstrakcijsko metodo, ki so jo opisali Witte in sod. (1970). Število TBK nam podaja koncentracijo malondialdehida v mg/kg vzorca. Analizirali smo vse vzorce (presne in toplotno obdelane), vsakega v dveh paralelkah po sledečem postopku.

V suho in čisto 10 ml epruveto s teflonskim pokrovčkom na navoj (Assistent, 976) smo na analitski tehtnici (SCALTEC SBA 41, 17816) zatehtali 0,100 ($\pm 0,001$) g predhodno homogeniziranega vzorca, dodali 1 ml 35 % raztopine trikloroacetne kisline (TKO; Merck, 1.00810) in 2 ml 0,36 % raztopine TBK. 0,36 % raztopino TBK smo pripravili tako, da smo v 200 ml merilno bučko zatehtali 0,36 g 2-tiobarbiturne kisline (Sigma, T-5500) in dopolnili do 100 g z 0,1 M Na₂SO₃. 0,1 molaro raztopino Na₂SO₃ smo pripravili tako, da smo v 200 ml bučko zatehtali 0,1 g Na₂SO₃ (Merck, 1.06657) in dopolnili z destilirano vodo do oznake.

Epruvete smo zaprli s teflonskim pokrovčkom in 5 min intenzivno stresali. Sledil je še dodatek 1 ml 0,9 % raztopine 6-diterciarnega butil-p-hidroksi toluena (BHT; Sigma-Aldrich, B-1378) v *n*-heksanu (Merck, 1.07023). Epruvete smo zaprli, premešali in za 30 min postavili v termoblok (VLM EC1) na 90 °C. Vmes smo vsebino epruвет večkrat premešali. Po ohlaiditvi smo dodali 1 ml led oetne kisline (Merck, 1.00056) in 2 ml kloroforma (CARLO ERBA, 438601), premešali in centrifugirali (Eppendorf, centrifuge 5810) 6 min pri 1500 × g. S kapalko smo nato prenesli vodno fazo (zgornjo plast) v kivete PS (BRANDTECH, 759071D) in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 532 nm na spektrofotometru (Shimadzu, UV 160 A).

Vzporedno z vzorci smo pripravili še slepi vzorec, kjer smo namesto vzorca (mesa) v epruveto zatehtali 0,1 g destilirane vode, in ga uporabili pri pripravi umeritvene krivulje.

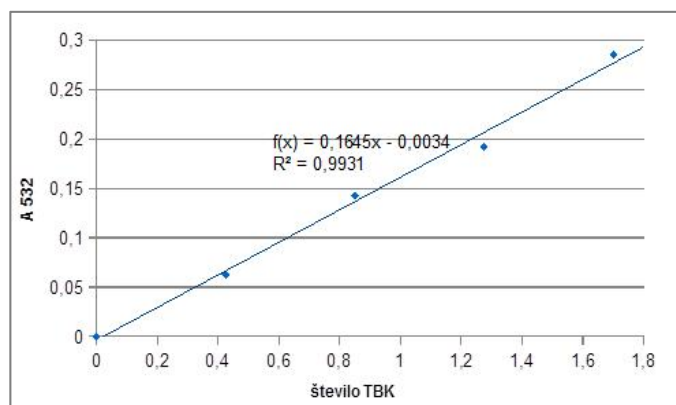
Umeritvena krivulja za določanje števila TBK

Najprej smo pripravili standardno raztopino 1,1,3,3-tetraoksiopropana (Sigma, T-9889) tako, da smo v 100 ml bučko zatehtali 7 mg 1,1,3,3-tetraoksiopropana (Sigma, T-9889) in dopolnili s heksanom (Merck, 1.04371) do oznake. 10 ml pripravljene standardne raztopine smo odpipetirali v čisto 100 ml bučko in dopolnili s heksanom (Merck, 1.07023) do oznake. Tako smo dobili 10-kratno redčitev. Nato smo v suhe epruvete s teflonskim pokrovčkom z navojem odpipetirali naslednje volumne 10-krat razredčene standardne raztopine (preglednica 10):

Preglednica 10: Volumni standardne raztopine in število TBK za pripravo umeritvene krivulje
Table 10: The volumes of standard solution and TBARs for the preparation of the calibration curve

epruveta	1-slepi vzorec	2	3	4	5
ml st. razt.	0	0,1	0,2	0,3	0,4
št. TBK	0	0,701	402	102	80

*Dodatek 0,1 ml standardne raztopine pomeni 0,7 TBK. V epruvete smo dodali posamezne reagente po ustreznem vrstnem redu in postopali enako kot pri vzorcu.



Slika 11: Umeritvena krivulja za določanje števila TBK v mariniranih mini filejih
Figure 11: Calibration curve to determine TBARs in marinated mini fillets

3.2.3.3 Določanje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola v mariniranih mini filejih

Holesterol in okside holesterola (OH) smo določali na vzorcih presnih mini filejev. Ob vsakem vzorčenju (1., 5. in 9. dan) smo iz vsake podskupine (glede na vrsto marinade) odvzeli po štiri mini fileje, jih združili in homogenizirali (Grindomix GM 200, Retsch, Nemčija) ter tako dobili en povprečen vzorec. Analize smo opravili v dveh paralelkah.

Za določanje vsebnosti oksidov holesterola v vzorcih mariniranih mini filejev smo uporabili metodo po Penko in sod. (2015), sestavljeno iz hladne saponifikacije, ekstrakcije, postopka ekstrakcije s trdno fazo (SPE) in določanja oksidov holesterola s tekočinsko kromatografijo s tandemskim masnim spektrometrom (LC-MS). Rezultate smo izrazili v mg/kg. Izračunali smo tudi stopnjo oksidacije po sledeči enačbi:

$$\frac{\sum \text{OH} \times 100}{\sum \text{OH} + \text{holesterol}} \quad \dots (15)$$

Saponifikacija

V 100 ml erlenmajerice z obrusom (Lenz, 3.0314.37) smo zatehtali 2,000 ($\pm 0,001$) g predhodno združenega in homogeniziranega vzorca. V erlenmajerice smo nato dodali 3 ml metilen klorida (CH_2Cl_2 ; Merck, 1.06044) in 7 ml predhodno pripravljene 1 M raztopine kalijevega hidroksida (KOH; Merck, 1.05033) v 96 % etanolu (Merck, 1.00971). V vsako erlenmajerico smo dodali še magnetna mešala, jih zaprli in vsebino nato mešali na magnetnem mešalniku (IKA, RT10 Power) 18 do 20 h v temnem prostoru in pri sobni temperaturi.

Ekstrakcija oksidov holesterola

Po saponifikaciji smo ves vzorec prenesli v 50 ml centrifugirke (Sarstedt, 62.548.004) ter dodali 10 ml dietiletra (Merck, 1.00921) in 10 ml destilirane vode. Centrifugirke smo zaprli, vsebino temeljito premešali in za 15 min postavili na ultrazvočno kopel (Bransonic 3510E – DTH, Branson, Nemčija). Sledilo je 6-min centrifugiranje (Eppendorf, 5810 centrifuge) na $1700 \times g$. Pri centrifugiranju pride do ločitve polarne in nepolarne faze. S stekleno pipeto smo odstranili večji del spodnje, polarne faze (približno 10 ml). V preostalo organsko fazo smo dodali 5 ml 0,5 M raztopine KOH (Merck, 1.05033) v destilirani vodi. Vse skupaj smo temeljito premešali in ponovno tretirali na ultrazvočni kopeli (Bransonic 3510E – DTH,

Branson, Nemčija) in centrifugi (Eppendorf, 5810 centrifuge) pri enakih pogojih. Ob ločitvi obeh faz smo ponovno odstranili spodnjo polarno fazo, v preostanek dodali 5 ml destilirane vode ter ponovili postopek mešanja, ultrazvočne kopeli in centrifugiranja pri zgoraj omenjenih pogojih. Ponovno smo dosegli ločitev faz, le da smo tokrat odpipetirali 5 ml zgornje organske faze, v katerih so se nahajali oksidi holesterola, v čiste, 20 ml vialle (Supelco, SU860097), dodali še 15 ml heksana (Merck, 1.04371) in jih zaprli z navojnimi pokrovčki (Supelco, SU860101) in jih do postopka SPE hranili v hladilniku pri (4 ± 1) °C.

Ekstrakcija s trdno fazo (SPE)

Za ekstrakcijo s trdno fazo (SPE) smo uporabili kolono Strata SI-1 (Phenomenex®; 8B-S012-FBJ). Vsako kolono smo najprej kondicionirali z 2,5 ml heksana (Merck, 1.04371) in eluat zavrgli. S kondicioniranjem smo dosegli aktivacijo površine polnila in s tem omogočili boljšo vezavo oksidov holesterola. Nato smo na kolono uvajali 20 ml vzorca (celotno količino vzorca, ki smo jo pripravili z ekstrakcijo). Da smo dosegli dobro vezavo OH v koloni, smo uravnavali počasno potovanje vzorca skozi kolono. Eluat smo zavrgli. Sledilo je izpiranje kolone; najprej z 2,5 ml heksana (Merck, 1.04371), nato pa še z 2,5 ml mešanice heksana (Merck, 1.04371) in dietiletra (Merck, 1.07026) v razmerju 75:25. Tako smo iz kolone izprali nezaželenne komponente, eluat pa smo zavrgli. Pred zadnjo fazo smo kolono posušili v pretoku zraka in nazadnje kolono spirali z 2 ml mobilne faze, mešanice acetonitrila (Sigma-Aldrich, 34851) in izopropanola (Merck, 1.00998) (v razmerju 55:45) in eluat lovili v epruveto. Vsebinsko epruvet, ki smo jo dobili s SPE, smo s stekleno kapalko (ISO 7712, Brand GmbH+Co., Nemčija) prenesli v temne vialle in sledila je analiza z LC-MS/MS.

Vzorke smo analizirali s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS) in uporabili sistem Agilent Technology 1100 (komponente aparature: glej pod točko 3.2.2.2).

Kromatografski pogoji:

- način kromatografije: RP (reverzna faza),
- kromatografska kolona Kinetex C18 ($2,6 \mu\text{m} \times 2,1 \times 100 \text{ mm}$) (Phenomenex, Torrance, ZDA, 00F-4439-B0),
- mobilna faza A: H_2O ,
- mobilna faza B: acetonitril (AcN),
- volumen injiciranja: 10 μl ,
- temperatura vzorcev: 8 °C,
- temperatura kolone: 45 °C.

Preglednica 11: Kromatografski pogoji (gradienti mobilne faze) pri določanju oksidov holesterola in holesterola

Table 11: Chromatography conditions (mobile phase gradient) to determine cholesterol oxides and cholesterol

Čas (min)	mobilna faza A (%)	mobilna faza B (%)	pretok (ml/min)
0,00	20	80	0,400
3,00	2	98	0,400
7,50	2	98	0,400
7,60	20	80	0,400
12,00	20	80	0,400

Za detekcijo OH in holesterola smo uporabili masni detektor Micromass Quattro Micro (Waters, Milford, MA, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (Electrospray Ionization - ESI), ki je deloval pri naslednjih pogojih:

- napetost kapilare 3,2 kV v pozitivnem načinu ionizacije (ESI+),
- napetost vhodne leče: 30 V,
- ekstraktor: 2 V,
- temperatura izvora: 120 °C,
- temperatura razpršilnega N₂: 350 °C,
- pretok N₂ vhodne leče: 50 l/h,
- pretok razpršilnega N₂: 400 l/h,
- način detekcije: MRM način (Multiple Reaction Monitoring).

Preglednica 12: Pogoji detekcije pri določanju 7 α -HC, 7 β -HC, 20 α -HC, 22-HC, 25-HC in holesterola v MRM

Table 12: Terms of detection for 7 α -HC, HC-7 β , 20 α -HC, HC-22, HC-25 and cholesterol in the MRM mode

Parameter	m/z	prehod	vhodna leča (V)	trkalna celica (V)	Rt (min)
7 α -HC	367,22	145,22	30	30	2,80
7 β -HC	367,22	145,22	30	30	3,90
20 α -HC	367,22	147,22	30	30	4,13
22-HC	367,22	147,22	30	30	3,50
25-HC	367,22	147,22	30	30	2,75
holesterol	369,18	147,22	30	30	7,81

7 α -HC: 7 α -hidroksiholesterol, 7 β -HC: 7 β -hidroksiholestrol, 20 α -HC: 20 α -hidroksiholesterol, 22-HC: 22-hidroksiholesterol, 25-HC: 25-hidroksiholesterol. M/z: razmerje masa/naboj. V: napetost. Rt: retenzijski čas

Detekcija na masnem spektrometru je potekala v MRM načinu in energiji trkalne celice 30 V. V preglednici 12 so predstavljeni pogoji detekcije (prehodi) pri določanju OH in holesterola.

Sledila je obdelava podatkov s programom Quantify v MassLynxTM V4.1.

OH in holesterol so bili določeni po njihovih retenzijskih časih v primerjavi z naslednjimi standardi: 7 α -hidroksiholesterol (Steraloids Inc., C6420-000); 7 β -hidroksiholesterol (Steraloids Inc., C6430-000); 20 α -hidroksiholesterol (Steraloids Inc., C6480-000); 22-hidroksiholesterol (Steraloids Inc., C6485-000); 25-hidroksiholesterol (Steraloids Inc., C6510-000) in holesterol (Sigma, C-8667).

Izkoristek holesterola in OH je od 81 % do 86 %, natančnost pa od 2,6% do 4,6%. Meje detekcije metode so bile od 10 ng do 13 ng injiciranega, meje kvantifikacije pa od 42 do 47 ng injiciranega. Izkoristek in kvantifikacija metode za določanje holesterola in različnih OH so bili določeni z metodo standardnega dodatka. V vzorec smo dodali vse analizirane komponente v štirih koncentracijah (0,5, 5, 25, 50 ng/g).

3.2.3.4 Vrednotenje senzoričnih lastnosti mariniranih piščančjih mini filejev

V sklopu III smo ovrednotili vpliv obogatitve piščančjega mesa z $n-3$, uporabe različnih nosilcev (sol, škrob, olje) ekstrakta in načina toplotne obdelave na senzorične lastnosti mariniranih piščančjih mini filejev.

Vrednotenje senzoričnih lastnosti smo opravili na mariniranih piščančjih mini filejih, ki smo jih ob vsakokratnem vzorčenju (po eno-, pet- in devetdnevem skladiščenju) obdelali s tremi različnimi postopki toplotne obdelave (žar, pečica, pečica IR).

Ocenjevanje, ki ga je izvedel panel štirih izkušenih preskuševalcev, je potekalo po enakem postopku kot je opisano v točki 3.2.2.3. Pri tem smo uporabili metodo kvantitativne deskriptivne analize z nestrukturirano lestvico (1-4-7) (Golob in sod., 2006).

Ocenjevali smo pojav tujih vonjev, žarke arome, arome po postanem (WOF) in ostalih tujih arom ter pri tem uporabili naslednja merila za ocenjevanje teh lastnosti:

Tuji vonji:

1 – ni tujih vonjev

7 – tuji vonji so močno izraziti

Žarka aroma:

1 – ni žarke arome

7 – žarka aroma je močno izrazita

Aroma po postanem (WOF):

1 – ni arome po postanem

7 – aroma po postanem je močno izrazita

Tuje arome:

1 – ni tujih arom

7 – tuje arome so močno izrazite

3.2.3.5 Določanje vsebnosti heterocikličnih aromatskih aminov (HAA)

Piščančje mini fileje, ki smo jih pripravili po postopku opisanem v točki 3.1.3.3, smo po toplotni obdelavi najprej senzorično ovrednotili in nato na teh vzorcih določili še vsebnost HAA, po postopku in metodi, ki sta opisana v točki 3.2.2.2.

Vsebnost HAA smo določili na povprečnem predhodno homogeniziranem vzorcu mini filejev posamezne podskupine (podskupine glede na uporabljen nosilec brinovega ekstrakta; olje, škrob, sol) obdelanih s tremi različnimi postopki toplotne obdelave. Dobljene rezultate smo izrazili v ng HAA/kg mini fileja.

3.2.3.6 Določanje vsebnosti kreatina in kreatinina

Kreatin oz. kreatinin je poleg reducirajočih sladkorjev in prostih AK pomemben prekurzor za tvorbo HAA. Ključna je njegova vloga predvsem pri tvorbi t.i. »termičnih« HAA oz. AIA, saj se le-ti brez kreatina oz. kreatinina ne tvorijo. Prisotnost kreatina/kreatinina

pomembno vpliva tudi na mutagenost HAA, saj se z višjo vsebnostjo kreatina/kreatinina dokazano poveča tudi mutagenost.

Vsebnost kreatina/kreatinina smo določali v presnih mini filejih ob vsakem vzorčenju (1., 5. in 9. dan skladiščenja) po nekoliko modificirani metodi kot jo je uporabila Stopar (2013), in sicer z metodo predhodnega segrevanja. Pri tem smo izpustili fazo ekstrakcije s trdno fazo (SPE). Rezultate smo izrazili v mmol/kg.

V 50 ml centrifugirko (Saerstedt, 62.548.004) smo zatehtali 3,000 ($\pm 0,001$) g shomogeniziranega presnega vzorca in dodali 30 ml destilirane vode. Vzorec smo nato še 2 min dodatno homogenizirali s homogenizatorjem (Ultra-turax 25, nastavek S25N-18G; IKA, Nemčija) pri 1100 obratih/min. Sledilo je 10-min segrevanje vzorca v vodni kopeli pri temperaturi 70 °C, da je potekla denaturacija v vzorcu prisotnih beljakovin. Nato smo vzorce temeljito premešali na vorteksu (MS2 Minishaker, IKA) in dobljeno suspenzijo najprej prefiltrirali preko filter papirja (Sartorius grade: 388). Dobljen filtrat smo nato prefiltrirali še preko celuloznega filtra (0,20 μm ; Minisart RC 15) in v vialo z navojem zbrali približno 1 ml filtrata. Tako pripravljene vzorce smo analizirali z LC-MS.

Vsebnost kreatina in kreatinina smo analizirali s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS) in uporabili sistem Agilent Technology 1100 enako kot pri določanju vsebnosti HAA ter OH in holesterola (komponente aparature: glej pod točko 3.2.2.2).

Kromatografski pogoji:

- način kromatografije: HILIC,
- kromatografska kolona: Xbridge™ HILIC 5 μm \times 2,0 \times 100 mm (Waters),
- mobilna faza A: 100 mM amonijev formiat v H₂O,
- mobilna faza B: acetonitril (AcN),
- volumen injiciranja: 10 μl ,
- temperatura vzorcev: 4 °C,
- temperatura kolone: 30 °C.

Preglednica 13: Kromatografski pogoji (gradienti mobilne faze) pri določanju kreatina in kreatinina

Table 13: Chromatography conditions (mobile phase gradient) to determine creatine and creatinine

Čas (min)	mobilna faza A (%)	mobilna faza B (%)	pretok (ml/min)
0,00	10	90	0,200
25,00	90	10	0,200
25,10	10	90	0,200
33,00	10	90	0,200

Za detekcijo kreatina in kreatinina smo uporabili masni detektor Micromass Quattro Micro (Waters, Milford, MA, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (Electrospray Ionization - ESI), ki je deloval pri naslednjih pogojih:

- napetost kapilare 3,5 kV v pozitivnem načinu ionizacije (ESI+),
- napetost vhodne leče: 0,3 V,

- temperatura izvora: 120 °C,
- temperatura razpršilnega N₂: 350 °C,
- pretok N₂ vhodne leče: 50 l/h,
- pretok razpršilnega N₂: 400 l/h.

Detekcija na masnem spektrometru je potekala v SIR načinu. V preglednici 14 so predstavljeni pogoji detekcije pri določanju kreatina in kreatinina.

Preglednica 14: Pogoji detekcije pri določanju vsebnosti kreatina in kreatinina

Table 14: Terms of detection of creatine and creatinine

Parameter	m/z (ESI+)	cona (V)	Rt (min)
kreatin	132,2	43	12,44
kreatinin	114,3	43	6,95

Obdelavo podatkov smo izvedli s programom Quantify v MassLynx™ V4.1.

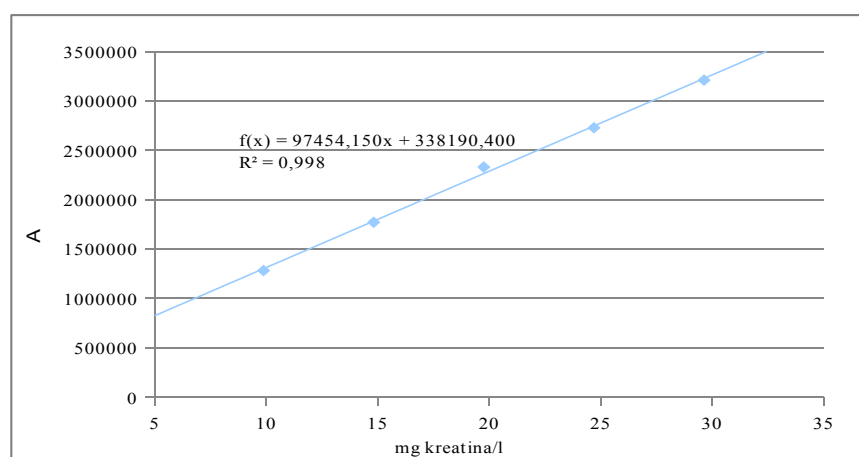
Umeritvena krivulja za določanje kreatina in kreatinina

Za kvantitativno določanje kreatina in kreatinina smo uporabili standard kreatina (Sigma, C0780) oz. kreatinina (Sigma, 4255). V 50 ml bučko smo zatehtali 25 mg standarda kreatina oz. kreatinina in do oznake dopolnili z destilirano vodo. Iz tako pripravljene standardne raztopine kreatina/kreatinina smo pripravili ustrezne redčitve, ki smo jih uporabili za pripravo umeritvene krivulje. Začetna koncentracija za kreatin (SS kreatin) je bila 494 mg/l, za kreatinin (SS kreatinin) pa 510 mg/l.

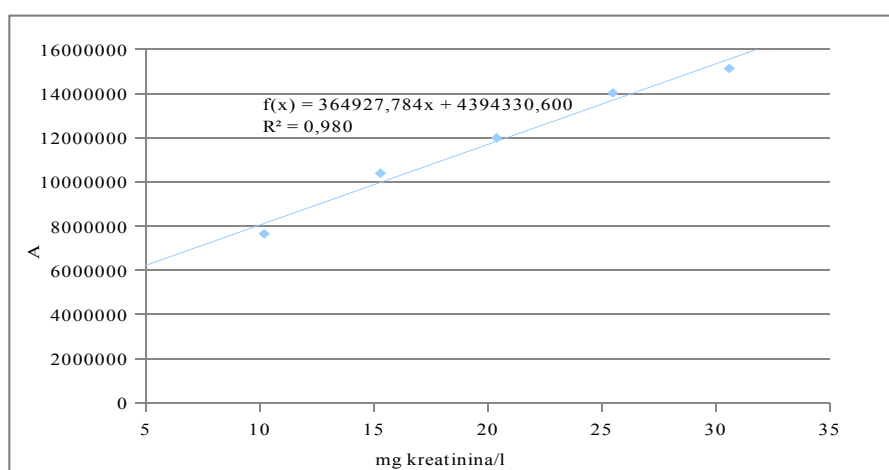
Preglednica 15: Redčitve osnovne raztopine (SS) kreatina/kreatinina za pripravo umeritvene krivulje

Table 15: Dilution of the stock solution (SS) of creatine/creatinine for the preparation of the calibration curve

Kreatin			Kreatinin		
Oznaka	SS kreatin (µl)	dH ₂ O (µl)	Oznaka	SS kreatinin (µl)	dH ₂ O (µl)
K001	20	980	Kr001	20	980
K002	30	970	Kr002	30	970
K003	40	960	Kr003	40	960
K004	50	950	Kr004	50	950
K005	60	940	Kr005	60	940



Slika 12: Umeritvena krivulja za določanje kreatina v mariniranih mini filejih
Figure 12: Calibration curve for determine creatine in marinated mini fillets



Slika 13: Umeritvena krivulja za določanje kreatinina v mariniranih mini filejih
Figure 13: Calibration curve to determine creatinine in marinated mini fillets

3.2.3.7 Statistična obdelava podatkov za sklop III

Rezultate, pridobljene iz analiz, smo pripravili in uredili s programom Microsoft Excel 2007. Osnovne statistične parametre smo izračunali s postopkom MEANS, s postopkom UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve (SAS Software, 1999). Analiza podatkov je bila izvedena s programsko opremo Statistical Analysis System (SAS) software, version 8.1 (SAS Institute, Cary, NC, ZDA).

Eksperiment za vrednotenje fizikalno-kemijskih parametrov (izguba mase med toplotno obdelavo, barvne vrednosti L^* , a^* in b^* , število TBK, vsebnost posameznih in skupnih OH ter stopnje oksidacije, kreatina, kreatinina in skupnega kreatina, posameznih in skupnih HAA) in senzoričnih lastnosti mariniranih piščančjih mini filejev je bil zastavljen kot faktorski poskus $2 \times 4 \times 3 \times 2$ (2 tipa piščančjega mesa (običajni in *n*-3-obogateni mini fileji), 4 skupine glede na vezavo ekstrakta brinovih jagod na nosilce (t.j. brez ekstrakta, olje, škrob in sol) in 3 načini toplotne obdelave (pečica IR, pečica in dvoploščni žar), dneva merjenja (1., 5. in 9. dan po pakiranju) in način pakiranja (t.j. MAP in vakuumsko)). Pričakovane povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane s testom LSM in primerjane pri 5 % tveganju.

3.2.4 Sklop IV: Različni aerobni pogoji v embalažni enoti in njihov vpliv na tvorbo produktov oksidacije in HAA v komercialnih piščančjih sekljancih, obogatenih z *n*-3 VNMK

V sklopu IV smo pripravili komercialne piščančje sekljance kot je opisano v točki 3.1.4.1. Na presnih sekljancih smo senzorično in instrumentalno ovrednotili barvo, izmerili vrednost pH, določili osnovno kemijsko sestavo (z vsebnostjo prekurzorjev HAA – kreatin/kreatinin) in maščobnokislinski profil ter število TBK. Senzorične lastnosti, vsebnost holesterola, OH in HAA pa smo določili na sekljancih po toplotni obdelavi.

V tem sklopu smo opravili nekatere analize, katerih metode in postopki so natančno opisani v predhodnih sklopih.

Instrumentalno merjenje barve smo opravili v štirih paralelkah za vsak način pakiranja po postopku, ki je opisan v točki 3.2.3.1.

Senzorično smo ovrednotili poslabšanje barve presnih sekljancev po osem dnevnem skladiščenju ter pojav tujih vonjev, žarke arome, arome po postanem (WOF) ter ostalih tujih arom pri toplotno obdelanih sekljancih. Senzorično ocenjevanje je potekalo v skladu z metodo kvantitativne deskriptivne analize, ki je opisana v točki 3.2.2.3 oz. 3.2.3.4. Skupina štirih preskuševalcev je pri tem uporabila strukturirano točkovno lestvico (od 0 do 4 točke), kjer vsaka točka poda stopnjo izraženosti določene senzorične lastnosti:

- točka 0: lastnost ni izražena,
- točka 1: lastnost je rahlo izražena,
- točka 2: lastnost je srednje izražena,
- točka 3: lastnost je močno izražena,
- točka 4: lastnost je zelo močno izražena.

Število TBK, ki kaže stopnjo oksidacije, smo določili po metodi, ki je opisana v točki 3.2.3.2, in sicer za vsak način pakiranja v treh paralelkah. Število TBK smo izrazili s pomočjo umeritvene krivulje s standardnim dodatkom.

Vsebnost holesterola, OH in HAA smo določili na povprečnem vzorcu toplotno obdelanih sekljancev iz šestih zavrtkov vsake od podskupin. Analize smo izvedli v dveh paralelkah (2 paralelki × 3 proizvodne ponovitve = 6 določanj). Za določanje vsebnosti holesterola in OH smo uporabili metodo po Polaku in sod. (2010), ki je natančno opisana v točki 3.2.3.3, medtem ko smo količino nastalih HAA v sekljancih določili z modificirano metodo, ki jo opisujejo Messner in Murkovic (2004) ter Sentellas in sod. (2004), po postopku opisanem v točki 3.2.2.2. Holesterol in okside holesterola smo izrazili v mg/kg sekljanca, HAA pa µg /kg sekljanca.

Poleg zgoraj navedenih analiz smo v sklopu IV opravili še analizo osnovne kemijske sestave in meritev vrednosti pH svežih sekljancev ter sestavo plinske mešanice v embalažnih enotah.

3.2.4.1 Določanje osnovne kemijske sestave in vrednosti pH

Analizo osnovne kemijske sestave nismo določali na vseh sekljancih, ker smo sklepali, da se njihova sestava za posamezno skupino (običajen, *n*-3-obogaten) bistveno ne razlikuje glede

na način pakiranja. Izbrali smo sekljance, ki so bili pakirani v MAP-hO₂. V en vzorec smo združili po tri pladnje iz vsake skupine in analizo nato opravili v dveh paralelkah. Skupaj smo opravili analizo na šestih vzorcih (1 × način pakiranja × 3 pladnji × 2 tipa mesa = 6).

Za določitev vsebnosti vode, beljakovin, maščob, soli in kolagena v izdelanih sekljancih smo uporabili hitro metodo določanja, ki temelji na uporabi bližnje infrardeče svetlobe (NIR). Homogenizirane vzorce smo prenesli v posebne okrogle pladnje (Foss, 60000304), jih razmazali in zgladili površino. Osnovno kemijsko sestavo smo nato izmerili z aparatom FoodScan™ Meat Analyser (Foss, Danska), ki zagotavlja tako ponovljivost meritev na sekljancih, ki je primerljiva s ponovljivostjo metod, ki temeljijo na odboju svetlobe na površini. Instrument smo predhodno kalibrirali in uporabili za merjenje vseh osnovnih parametrov, kot so vsebnost vode, beljakovin in maščob.

Ponovljivost meritev smo zagotovili z analiziranjem šestih naključno izbranih vzorcev, pri katerih je znašal koeficient variabilnosti rezultatov vsebnosti vode, beljakovin in maščob manj kot 0,2 %.

Z NIR analizo smo vsebnost maščobe/vode določili z natančnostjo 0,4 % do 0,8 %, vsebnost beljakovin pa z natančnostjo 0,3 % do 0,6 %. Ponovljivost meritev smo zagotovili z analiziranjem naključnega vzorca v šestih paralelkah, koeficient variabilnosti rezultatov vsebnosti vode, beljakovin in maščob je znašal manj kot 0,2 %.

Vzorce sekljancev smo po NIR analizi shranili in jih nato uporabili še za določanje maščobnokislinske sestave, ki smo jo izvedli po postopku, ki je opisan v točki 3.2.2.1. Analizo smo izvedli v dveh paralelkah.

Poleg osnovne kemijske analize in maščobnokislinskega profila smo okviru določanja kemijske sestave določili še vsebnost kreatina/kreatinina, ki je ključen prekursor pri tvorbi HAA. Analizo smo izvedli na presnih sekljancih po postopku in metodi, ki sta opisana v točki 3.2.3.6. Rezultate smo iz vrednotili s pomočjo umeritvene krivulje in jih izrazili v mmol/kg sekljanca.

Merjenje vrednosti pH smo izvedli z vbojno kombinirano stekleno gelsko elektrodo tipa 03 (Testo pH elektroda) priključeno na pH meter (Testo 230, Testo, Italija) opremljen s temperaturnim tipalom (Testo, 0613 2211). Natančnost merjenja je bila ± 0,01 enote. pH meter je bil umerjen na pH 4,00 in pH 7,00. Vrednost pH smo izmerili dvakrat, v geometrijskem središču vsakega vzorca.

3.2.4.2 Sestava plinske mešanice v embalažni enoti

Koncentracijo plinov (O₂ in CO₂) smo določili v embalažnih enotah takoj ob pakiranju in po osmih dneh skladiščenja. Meritve smo opravili s prenosnim analizatorjem plinov OXYBABY® V (OxyBaby® V; Witt-Gasetechnik GmbH & Co KG, Avstrija). Ta aparat je posebej namenjen analizi plinov v embalažnih enotah živilskih izdelkov, še posebej za pakirane v modificirani atmosferi. Pred uporabo smo analizator vedno kalibrirali na svež zrak v prostoru. Absolutna natančnost meritev (0,1 %) pri temperaturi 20 °C je bila dosežena pri koncentracijah O₂ <10 vol %, relativna natančnost <1 % pa pri koncentracijah O₂ od 10 vol % do 100 vol %.

3.2.4.3 Statistična obdelava podatkov za sklop IV

Rezultate, pridobljene iz analiz, smo pripravili in uredili s programom Microsoft Excel 2007. Osnovne statistične parametre smo izračunali s postopkom MEANS, s postopkom UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve (SAS Software, 1999). Analiza podatkov je bila izvedena s programsko opremo Statistical Analysis System (SAS) software, version 8.1 (SAS Institute, Cary, NC, ZDA).

Eksperiment za vrednotenje fizikalno-kemijskih (izguba mase med toplotno obdelavo, barvne vrednosti L^* , a^* in b^* , število TBK, vsebnost posameznih in skupnih OH ter stopnje oksidacije, kreatina, kreatinina in skupnega kreatina, posameznih in skupnih HAA) in senzoričnih lastnosti komercialnih piščančjih sekljancev je bil zastavljen kot faktorski poskus $2 \times 4 \times 3$ (2 tipa piščančjega mesa (običajni in *n*-3-obogateni sekljanci), 4 sestave plinov v embalažni enoti (t.j. WF-ICO₂, MAP-hCO₂, MAP-hO₂ in MAP-LO₂) in 3 proizvodne ponovitve). Interakcija tip piščančjega mesa \times sestava atmosfere v embalažni enoti ni bila statistično značilna ($p > 0,05$), zato v model ni bila vključena. Poskus merjenja sestave plinov v embalažnih enotah je bil prav tako zastavljen kot faktorski poskus $2 \times 4 \times 3$ (2 časa skladiščenja (takoj in po osmih dneh), 4 sestave plinov v embalažni enoti in 3 proizvodne ponovitve). Pričakovane povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane s testom LSM in primerjane pri 5 % tveganju. Pearsonovi korelacijski koeficienti (r) med izmerjenimi parametri so bili izračunani s postopkom CORR (SAS Software, 1999).

4 REZULTATI

4.1 SKLOPI I: KARAKTERIZACIJA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV

4.1.1 Določanje skupnih fenolnih spojin

V preglednici 16 so podani rezultati določanja skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v rastlinskih ekstraktih brinovih jagod, lubja bora, rožmarina, jabolčnih oljčnih in grozdnih tropin ter grozdnih pešk, izraženih kot galna kislina v mg na liter ekstrakta. Največ skupnih fenolnih snovi vsebujejo ekstrakti lubja bora (LB6), rožmarina (ROŽ2, ROŽ3 in ROŽ4) in grozdnih pešk (GP1), in sicer med 1501 in 4742 mg/l, izraženih kot galna kislina, temu sledijo ostali ekstrakti, ki vsebujejo tudi 10-krat manj skupnih fenolnih snovi.

Preglednica 16: Rezultati določanja skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v rastlinskih ekstraktih brinovih jagod, lubja bora, rožmarina, jabolčnih oljčnih in grozdnih tropin ter grozdnih pešk, izraženih kot galna kislina v mg na liter ekstrakta

Table 16: The results of total phenolic compounds determination by the method of Folin-Ciocalteu in plant extracts of juniper berries, pine bark, rosemary, apple, olive and grape pomace as well as grape seed, expressed as gallic acid in mg per liter of extract

Ekstrakt	C_{sfs} (mg/l)	standardni odklon
BR1	577,5	82,6
BR3	426,2	63,1
BR4	189,4	60,5
LB3	387,2	-
LB4	310,2	-
LB5	320,8	-
LB6	4742,0	-
ROŽ2	1501,0	-
ROŽ3	2766,2	-
ROŽ4	222,2	-
JT1	35,4	-
JT2	39,4	-
JT3	42,7	-
OT1	183,0	-
OT2	519,4	-
GT1	788,7	-
GP1	2659,9	-

Legenda: c_{sfs} (mg/l) – koncentracija skupnih fenolnih spojin, izraženi kot galna kislina v mg na liter ekstrakta; BR1 – brinove jagode (Volče, 550 m n.m.v.), BR3 – brinove jagode (kupljene), BR4 – brinove jagode (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB3 – lubje črnega bora (Volče, 550 m n.m.v.), LB4 – lubje rdečega bora, LB5 – lubje zelenega bora, LB6 – lubje pinje (območje Kopera), LB6 filter – lubje pinje (območje Kopera) preko filtra, ROŽ2 – suh rožmarin (Kotanyi), ROŽ3 – suh rožmarin (Maestro), ROŽ4 – svež rožmarin (območje Kopera), JT1 – jabolčne tropine sorte Idared, JT2 – jabolčne tropine sorte Gloster, JT3 – jabolčne tropine sorte Mutsu, OT1 – oljčne tropine sorte Belica, OT2 – oljčne tropine sorte Črnica, GT1 – grozdnje tropine sorte Refošk, GP1 – grozdnje peške sorte Refošk

Legend: c_{sfs} (mg l⁻¹) – concentration of total phenolic compounds as gallic acids (mg l⁻¹ of extract); BR1 – juniper berries (Volče, 550 m n.m.v.), BR3 – juniper berries, BR4 – juniper berries (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB3 – black pine bark (Volče, 550 m n.m.v.), LB4 – red pine bark, LB5 – green black pine bark, LB6 – pinus bark (Koper), ROŽ2 – dry rosemary (Kotanyi), ROŽ3 – dry rosemary (Maestro), ROŽ4 – fresh rosemary (Koper), JT1 – apple pomace, Idared, JT2 – apple pomace, Gloster, JT3 – apple pomace, Mutsu, OT1 – olive pomace, Belica, OT2 – olive pomace, sorte Črnica, GT1 – grape pomace, Refošk, GP1 – grape seeds, Refošk

Metoda Folin-Ciocalteu je preprosta, občutljiva in tudi natančna metoda, ki se pogosto uporablja za določanje skupnih fenolnih spojin v rastlinskih materialih. Pomanjkljivost te metode je v tem, da z reagentom FC reagirajo tudi številne druge substance, ki motijo analizo. To so večinoma ogljikovi hidrati (sladkorji), nekatere aminokisliline, žveplov dioksid, askorbinska kislina, aromatični amini, organske kisline, Fe(II), nefenolne organske snovi in drugi reducenti (Roura in sod., 2009). Prav to je najverjetneje razlog, da so razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin (preglednica 16) tudi znotraj posameznih skupin (brinove jagode, lubje bora, oljčne tropine) precej velike, na kar vpliva verjetno tudi področje rasti in obdelave posameznega rastlinskega materiala.

4.1.2 Določanje posameznih fenolnih spojin

V izbranih etanolnih ekstraktih smo določili tudi koncentracije nekaterih najbolj zastopanih fenolnih spojin, katerih rezultati so predstavljeni v prilogi A.

4.1.3 Določanje citotoksičnosti in genotoksičnosti etanolnih ekstraktov

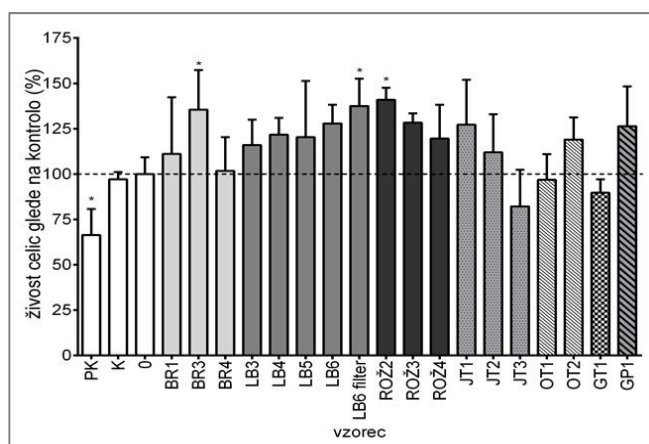
4.1.3.1 Test MTS in MTT za določanje citotoksičnosti

Izbrane etanolne ekstrakte smo v nadaljevanju nameravali uporabiti kot dodatke k živilu (meso, sekljanci), ki so bili namenjeni za humano uživanje, zato smo predhodno želeli preveriti njihovo morebitno citotoksično oz. genotoksično aktivnost.

Morebitno citotoksično delovanje izbranih etanolnih rastlinskih ekstraktov smo določali s testom MTS oz. MTT po 24-urni izpostavitvi celic HepG2. Pri testiranju genotoksičnega delovanja neke snovi je pomembno, da proučujemo koncentracije, ki ne vplivajo na živost celic. Pri obeh testih smo uporabili 1 v/v % raztopino posameznega ekstrakta (končna koncentracija EtOH = 0,7 %), s katero smo tretirali celice HepG2. Izvedli smo oba testa saj so bili nekateri vzorci obarvani, zaradi česar lahko pri testu MTS dobimo lažno pozitivne rezultate, ki so posledica obarvanosti vzorca in ne povečane aktivnosti encimov, ki jo merimo. Tako smo ugotovitve testa MTS nadalje potrdili še s testom MTT, ki je bolj primeren tudi za obarvane vzorce.

Rezultati obeh testov so pokazali (slika 14 in slika 15), da živost celic ni bila v nobenem primeru zmanjšana za več kot 30 %. To potrjuje našo predpostavko, da noben izmed testiranih rastlinskih ekstraktov pri koncentraciji 1 v/v % ni vplival na živost celic HepG2.

Iz slike 14 in 15 je razvidno, da je v nekaterih primerih % živost celic celo višja kot v kontrolni skupini. Izstopali so predvsem ekstrakti lubja bora. Možna razlaga za ta pojav je, da ti ekstrakti vsebujejo določene snovi, ki stimulatивно vplivajo na delitev celic oz. da povečajo aktivnost mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze zaradi spremenjenih celičnih procesov pod vplivom ekstraktov. Možen razlog za takšen rezultat pa je tudi morebiten zaostanek barve samega ekstrakta v celicah, kar lahko premakne spekter samih meritev. To so naša predvidevanja, ki pa jih ne moremo potrditi.

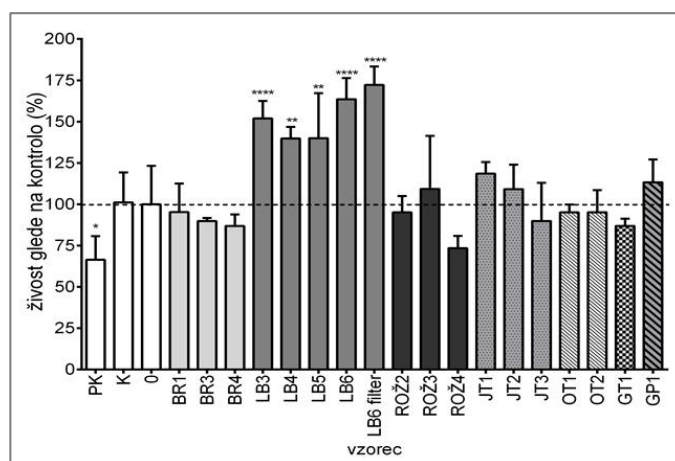


Legenda: PK – pozitivna kontrola (etoposid 30 µg/ml), K – kontrola gojišča, 0 – kontrola topila, BR1 – brinove jagode (Volče, 550 m n.m.v.), BR3 – brinove jagode (kupljene), BR4 – brinove jagode (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB3 – lubje črnega bora (Volče, 550 m n.m.v.), LB4 – lubje rdečega bora, LB5 – lubje zelenega bora, LB6 – lubje pinje (območje Kopera), LB6 filter – lubje pinje (območje Kopera) preko filtra, ROŽ2 – suh rožmarin (Kotanyi), ROŽ3 – suh rožmarin (Maestro), ROŽ4 – svež rožmarin (območje Kopera), JT1 – jabolčne tropine sorte Idared, JT2 – jabolčne tropine sorte Gloster, JT3 – jabolčne tropine sorte Mutsu, OT1 – oljčne tropine sorte Belica, OT2 – oljčne tropine sorte Črnica, GT1 – grozdne tropine sorte Refoš, GP1 – grozdne peške sorte Refoš

PK – positive control (etoposid 30 µg/ml), K – broth control, 0 – control – solvent, BR1 – juniper berries (Volče, 550 m n.m.v.), BR3 – juniper berries, BR4 – juniper berries (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB3 – black pine bark (Volče, 550 m n.m.v.), LB4 – red pine bark, LB5 – green black pine bark, LB6 – pinus bark (Koper), ROŽ2 – dry rosemary (Kotanyi), ROŽ3 – dry rosemary (Maestro), ROŽ4 – fresh rosemary (Koper), JT1 – apple pomace, Idared, JT2 – apple pomace, Gloster, JT3 – apple pomace, Mutsu, OT1 – olive pomace, Belica, OT2 – olive pomace, sorte Črnica, GT1 – grape pomace, Refoš, GP1 – grape seeds, Refoš

Slika 14: Določanje živosti celic HepG2 (%) s testom MTS (glede na topilo) po 24 -urnem tretiranju z rastlinskimi ekstrakti

Figure 14: Viability (%) of HepG2 cells measured by MTS assay (calculated on solvent) after 24 h treatment with plant extracts



Legenda: glej sliko 14; Legend: see Figure 14

Slika 15: Določanje živosti celic HepG2 (%) s testom MTT (glede na topilo) po 24-urnem tretiranju z rastlinskimi ekstrakti

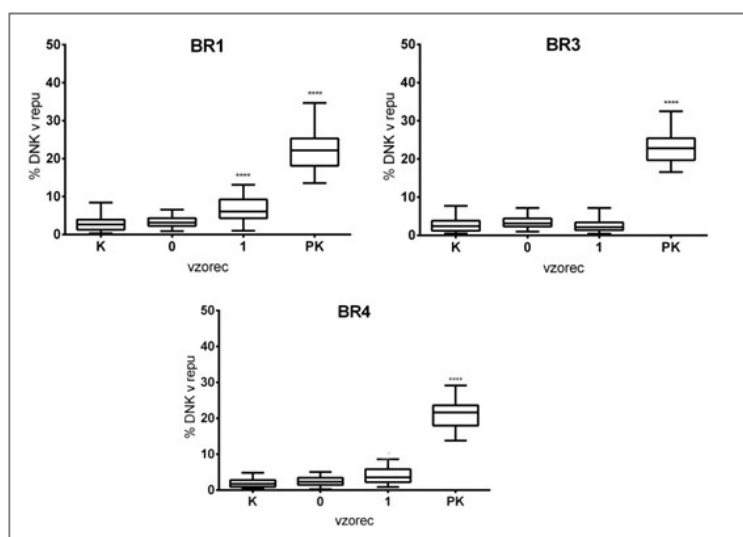
Figure 15: Viability (%) of HepG2 cells measured by MTT assay (calculated on solvent) after 24 h treatment with plant extracts

4.1.3.2 Test komet za določanje genotoksičnosti rastlinskih ekstraktov

S testom komet smo ugotavljali nastanek prelomov DNK v celicah, ki so bile izpostavljene rastlinskemu ekstraktu. Z alkalno različico testa komet smo poleg eno- in dvovertičnih prelomov DNK, ki so posledica neposrednega delovanja ekstraktov, zaznavali tudi prelome, ki nastanejo kot posledica popraviljanja poškodb DNK povzročenih zaradi dodatka ekstraktov.

Celice HepG2 smo za 24 h izpostavili 1 % raztopinam različnih rastlinskih ekstraktov in določili delež poškodovane DNK, ki se nahaja v repu. Na slikah od 16 do 20 je prikazan povprečni delež DNK v repu (%) treh neodvisnih ponovitev poskusa. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 30 μ M benzo-a-piren (BaP).

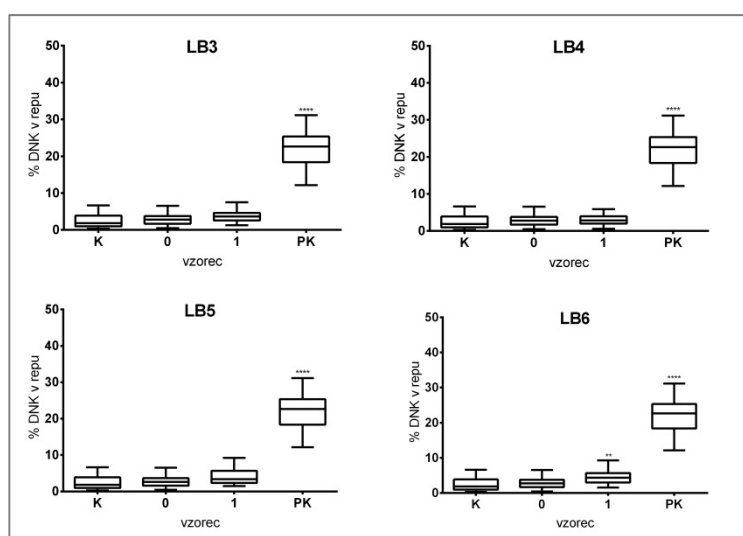
Iz slik 16-20 je razvidno, da ekstrakti v večini primerov niso povzročili statistično značilnega povečanja prelomov DNK v primerjavi s kontrolno skupino. Med vsemi ekstrakti nekoliko izstopa samo vzorec BR1 (slika 16). Pri tem je delež poškodovane DNK v repu le nekoliko povečan glede na kontrolo in sklepamo, da to nima pomembnega biološkega vpliva. To lahko sklepamo tudi glede na preostala dva ekstrakta brinovih jagod (BR3 in BR4), kjer je delež poškodovane DNK v repu v območju kontrole.



Legenda: K – kontrola gojišča, 0 – kontrola topila, 1 – posamezen vzorec, PK – pozitivna kontrola (etoposid 30 μ g/ml)

Slika 16: Nastanek poškodb DNK (% DNK v repu) pri celicah HepG2 po 24-urni izpostavitvi 1 v/v % raztopini ekstraktov brinovih jagod (BR1, BR3 in BR4)

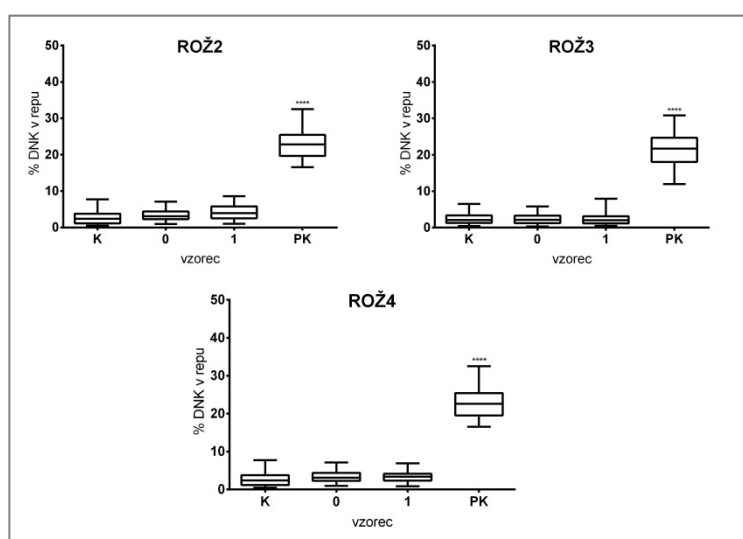
Figure 16: DNA damage (percentage tail DNA) in HepG2 cells after 24 hours of exposure to 1 v/v % solution of different juniper berries extracts (BR1, BR3 and BR4)



Legenda: 0 – kontrola topila, K – kontrola gojišča, PK – pozitivna kontrola (etoposid 30 µg/ml)

Slika 17: Nastanek poškodb DNK (% DNK v repu) pri celicah HepG2 po 24-urni izpostavitvi 1 v/v % raztopini ekstraktov lubja bora (LB3, LB4, LB5 in LB6)

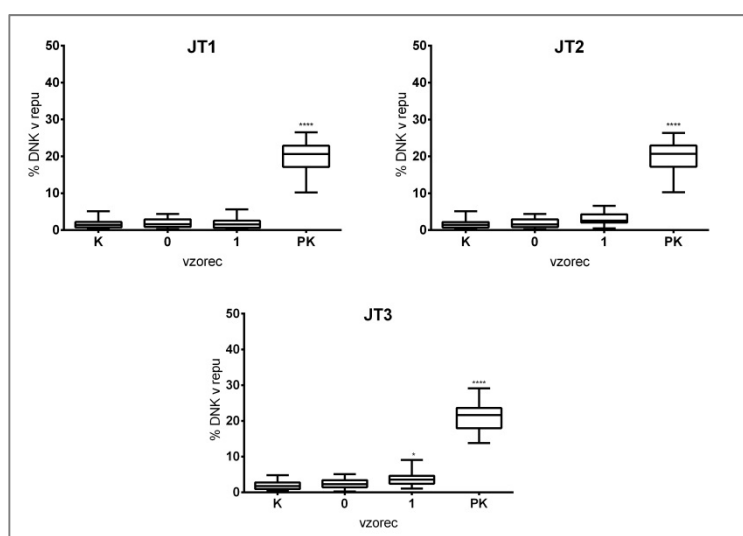
Figure 17: DNA damage (percentage tail DNA) in HepG2 cells after 24 hours of exposure to 1 v/v % solution of different pine bark extract (LB3, LB4, LB5 and LB6)



Legenda: 0 – kontrola topila, K – kontrola gojišča, PK – pozitivna kontrola (etoposid 30 µg/ml)

Slika 18: Nastanek poškodb DNK (% DNK v repu) pri celicah HepG2 po 24-urni izpostavitvi 1 v/v % raztopini ekstraktov rožmarina (ROŽ2, ROŽ3 in ROŽ4)

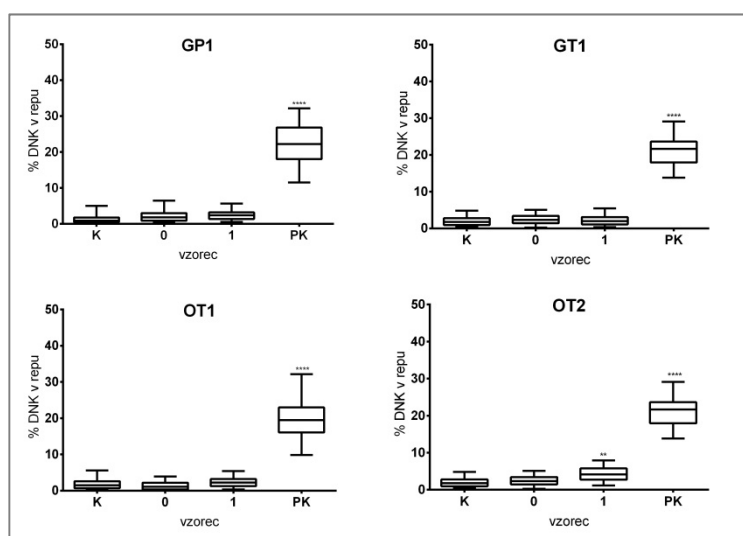
Figure 18: DNA damage (percentage tail DNA) in HepG2 cells after 24 hours of exposure to 1 v/v % solution of different rosemary extract (ROŽ2, ROŽ3 and ROŽ4)



Legenda: 0 – kontrola topila, K – kontrola gojišča, PK – pozitivna kontrola (etoposid 30 µg/ml)

Slika 19: Nastanek poškodb DNK (% DNK v repu) pri celicah HepG2 po 24-urni izpostavitvi 1 v/v % raztopini ekstraktov jabolčnih tropin (JT1, JT2 in JT3)

Figure 19: DNA damage (percentage tail DNA) in HepG2 cells after 24 hours of exposure to 1 v/v % solution of different appleskins extract (JT1, JT2 and JT3)



Legenda: 0 – kontrola topila, K – kontrola gojišča, PK – pozitivna kontrola (etoposid 30 µg/ml)

Slika 20: Nastanek poškodb DNK (% DNK v repu) pri celicah HepG2 po 24-urni izpostavitvi 1 v/v % raztopini ekstraktov grozdnih pešk (GP1) in tropin (GT1) ter oljčnih tropin (OT1 in OT2)

Figure 20: DNA damage (percentage tail DNA) in HepG2 cells after 24 hours of exposure to 1 v/v % solution of different grapeseeds (GP1) and skins (GT1) extract as well as different olive pomace extract (OT1 and OT2)

Testi za določanje citotoksične in genotoksične aktivnosti so pokazali, da so vsi izbrani ekstrakti primerni za humano prehrano. Na osnovi teh ugotovitev ter predhodnih raziskav, ki so pokazale določene pozitivne učinke pri upočasnitvi ali preprečitvi oksidativnih procesov,

smo se odločili, da bomo v nadaljnjih sklopih uporabili ekstrakte brinovih jagod, lubja bora in rožmarina. V sklopu III smo se nato omejili samo na izbran ekstrakt brinovih jagod (BR4), saj je v sklopu II med vsemi ekstrakti izkazal za boljšega predvsem pri preprečevanju tvorbe HAA pri *n-3*-obogatenih seklajncih.

4.2 SKLOP II: VEZAVA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV NA RAZLIČNE NOSILCE IN NJIHOV VPLIV NA TVORBO HAA V PIŠČANČJIH SEKLJANCIH, OBOGATENIH Z *n-3* VNMK

4.2.1 Predposkus

V prvi fazi sklopa II smo opravili predposkus, v okviru katerega smo določili maščobnokislinski profil običajnih in *n-3*-obogatenih piščančjih filejev, ki smo jih nato uporabljali v nadaljevanju sklopa II in v sklopu III. Podrobni rezultati analize maščobnokislinske sestave filejev so predstavljeni v preglednici 17.

Rezultati analize so potrdili predvidevanje, da prehrana piščancev vpliva na vsebnost določenih MK v samem mesu teh živali. V okviru eksperimenta smo analizirali prsni file piščancev, ki so bili krmljeni z običajno krmo ter tistih, ki so bili krmljeni s krmo obogateno z lanenimi semeni, ki so bogat vir *n-3* VNMK. Sestava ter deleži *n-3* in *n-6* običajne (konvencionalne) krme in krme obogatene z *n-3* VNMK so prikazani v preglednici 5.

Rezultati, ki so prikazani v preglednici 17, kažejo da je delež skupnih *n-3* VNMK v *n-3*-obogatenih filejih več kot 2-krat večji kot v običajnih filejih, medtem ko je delež *n-6* VNMK zelo podoben. To posledično pomeni, da se pri *n-3*-obogatenih filejih bistveno izboljša tudi razmerje *n-6/n-3*, ki znaša 4,5 : 1, medtem ko je v običajnih filejih to razmerje bistveno večje in s tem bistveno manj ugodno (11,2 : 1).

K povečanju deleža skupnih *n-3* VNMK in s tem tudi ugodnejšemu razmerju *n-6/n-3* največ prispeva α -linolenska kislina (ALA, 18:3*cis*-9,12,15), ki v običajnem fileju predstavlja 1,76 %, v *n-3*-obogatenem pa kar 2,5-krat več, in sicer 4,33 %.

Krma obogatena z lanenim semenom vpliva tudi na povečano vsebnost dokozapentoenojske (DPA, 22:5*n-3*) in dokozaheksaenojske (DHA, 22:6*n-3*) kisline, medtem ko je delež eikozapentaenojske kisline (EPA, 20:5*n-3*) pod mejo detekcije.

Z namenom določitve (optimalnih) pogojev za proučevanje tvorbe HAA v piščančjem mesu smo v sklopu predposkusa testirali vpliv različne stopnje pečenosti in načina toplotne obdelave (pečica, pečica IR, žar) na tvorbo HAA v običajnih in *n-3*-obogatenih piščančjih filejih.

V preglednici 18 so prikazani rezultati vsebnosti skupnih in nekaterih posameznih HAA, ki se v piščančjem mesu tvorijo v večjem obsegu in tako prispevajo glavnino k skupnim HAA. Vsi rezultati so predstavljeni v prilogi B.

Preglednica 17: Maščobne kisline in njihova vsebnost v običajnih in *n*-3-obogatenih piščančjih filejih

Table 17: Fatty-acids and their contents and in the control and *n*-3-enriched chicken fillets

Maščobna kislina/obogatitev	Vsebnost (g/100 g SMK) v skupini	
	običajen	<i>n</i> -3-obogaten
8:0	0,10	0,01
10:0	0,27	0,02
11:0	0,01	<0,01
12:0	0,43	0,22
13:0	0,01	<0,01
14:0	1,62	0,68
14:1 <i>cis</i> -9	0,27	0,18
15:0	0,18	0,11
15:1 <i>cis</i> -5	0,08	0,14
16:0 (palmitinska)	22,95	21,30
16:1 <i>trans</i> -9	0,41	0,41
16:1 <i>cis</i> -9	4,40	5,10
17:0	0,20	0,16
17:1 <i>trans</i> -9	0,15	0,15
17:1 <i>cis</i> -9	0,17	0,08
18:0 (stearinska)	6,79	5,65
18:1 <i>trans</i> -9	0,42	0,23
18:1 <i>cis</i> -9 (oleinska)	37,45	39,45
18:1 <i>cis</i> -11	0,00	0,00
18:2 <i>cis</i> -9,12 (linolna)	20,28	19,80
18:3 <i>cis</i> -6,9,12	0,16	0,17
18:3 <i>cis</i> -9,12,15 (ALA)	1,76	4,33
20:0	0,12	0,11
20:1 <i>cis</i> -8	0,05	0,07
20:1 <i>cis</i> -11	0,36	0,35
20:2 <i>cis</i> -11,14	0,16	0,14
20:3 <i>cis</i> -9,11,14	0,14	0,13
20:4&20:3	0,41	0,46
20:5 <i>cis</i> -5,8,11,14,17 (EPA)	<0,01	<0,01
22:5 <i>cis</i> -4,7,10,13,16	0,09	0,10
22:5 <i>cis</i> -7,10,13,16,19 (DPA)	0,07	0,15
22:6 <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19 (DHA)	0,04	0,06
NMK	32,68	28,26
ENMK	43,75	46,19
VNMK	23,56	25,55
<i>n</i> -6 MK	20,99	20,55
<i>n</i> -3 MK	1,87	4,53
razmerje <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	11,20	4,53
razmerje večkrat nenasičene/nasičene	0,72	0,90

SMK, skupne maščobne kisline; *n*-6: 18:2*cis*-9,12 + 18:3*cis*-6,9,12 + 20:4 & 20:3 + 22:5*cis*-4,7,10,13,16; *n*-3: 18:3*cis*-9,12,15 + 22:5*cis*-7,10,13,16,19 + 22:6*cis*-4,7,10,13,16,19; razmerje *n*-6/*n*-3: (18:2*cis*-9,12 + 18:3*cis*-6,9,12 + 20:4 & 20:3 + 22:5*cis*-4,7,10,13,16) / (18:3*cis*-9,12,15 + 22:5*cis*-7,10,13,16,19 + 22:6*cis*-4,7,10,13,16,19); razmerje večkrat nenasičene/nasičene: (18:2*cis*-9,12 + 18:3*cis*-6,9,12 + 20:4 & 20:3 + 22:5*cis*-4,7,10,13,16 + 18:3*cis*-9,12,15 + 22:5*cis*-7,10,13,16,19 + 22:6*cis*-4,7,10,13,16,19) / (6:0 + 8:0 + 10:0 + 12:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0)

TFA, total fatty acids; *n*-6: 18:2*cis*-9,12 + 18:3*cis*-6,9,12 + 20:4 & 20:3 + 22:5*cis*-4,7,10,13,16; *n*-3: 18:3*cis*-9,12,15 + 22:5*cis*-7,10,13,16,19 + 22:6*cis*-4,7,10,13,16,19; *n*-6/*n*-3 ratio: (18:2*cis*-9,12 + 18:3*cis*-6,9,12 + 20:4 & 20:3 + 22:5*cis*-4,7,10,13,16) / (18:3*cis*-9,12,15 + 22:5*cis*-7,10,13,16,19 + 22:6*cis*-4,7,10,13,16,19); polyunsaturated/ saturated ratio: (18:2*cis*-9,12 + 18:3*cis*-6,9,12 + 20:4 & 20:3 + 22:5*cis*-4,7,10,13,16 + 18:3*cis*-9,12,15 + 22:5*cis*-7,10,13,16,19 + 22:6*cis*-4,7,10,13,16,19) / (6:0 + 8:0 + 10:0 + 12:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0)

Preglednica 18: Vpliv načina toplotne obdelave/dosežene središčne temperature in dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3–obogatitev) na vsebnost ($\mu\text{g}/\text{kg}$) nekaterih posameznih in skupnih HAA v skorji toplotno obdelanih piščančjih filejev

Table 18: Effects of type of thermal treatment/internal temperature and ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) on content ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of some individual and total heterocyclic amines in surface layer of thermally treated chicken fillets

obogatitev	običajen	<i>n</i> -3	$p_E(\text{SEM})$	običajen	<i>n</i> -3	$p_E(\text{SEM})$	običajen	<i>n</i> -3	$p_E(\text{SEM})$
Način TO/HAA	MeIQx			PhIP			skupni HAA		
IR/82 °C	1,19	1,12	nz(0,67)	1,88 ^B	0,23 ^C	nz(1,57)	3,86 ^B	1,72 ^B	nz(2,67)
IR/95 °C	7,55	5,54	nz(5,24)	17,51 ^{BA}	5,19 ^{CB}	nz(12,63)	32,64 ^{BA}	14,31 ^B	nz(23,32)
pečica/82 °C	0,78	0,63	nz(0,62)	1,30 ^B	0,80 ^C	nz(0,78)	3,38 ^B	3,53 ^B	nz(1,08)
pečica/95 °C	2,38	1,94	nz(1,21)	1,56 ^B	1,35 ^C	nz(1,04)	10,10 ^B	10,96 ^B	nz(6,54)
žar/82 °C	3,67	3,30	nz(0,71)	17,81 ^{BA}	12,92 ^B	nz(2,83)	30,87 ^{BA}	22,21 ^B	nz(5,41)
žar/95 °C	7,07	4,15	nz(3,79)	34,84 ^A	28,69 ^A	nz(12,00)	63,06 ^A	47,20 ^A	nz(24,97)
$p_{TO}(\text{SEM})$	nz(3,32)	nz(2,57)		*(10,40)	*** (4,18)		*(20,12)	** (9,61)	

značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_E – statistična verjetnost vpliva obogatitve prehrane z *n*-3 VNMK; p_{TO} – statistična značilnost vpliva načina toplotne obdelave/dosežena središčna temperatura; srednje vrednosti z različno črko (^{A,B,C}) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$, značilnost razlik med načini toplotne obdelave dosežena središčna temperatura)

levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; p_E , statistical probability of enrichment effect; p_{TO} , statistical probability of thermal treatment/internal temperature effect; SEM, standard error of mean; means with a different superscript within column (^{A,B,C}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different types of thermal treatment/internal temperature)

Iz podanih rezultatov preglednice 18 je razvidno, da se v *n*-3–obogatenem mesu pri vseh načinih toplotne obdelave in stopnjah pečenosti tvori manj posameznih in skupnih HAA glede na običajno meso, vendar razlike niso statistično značilne.

Pri običajnem in *n*-3–obogatenem mesu lahko ugotovimo precej velike razlike v količini nastalih posameznih in skupnih HAA glede na način toplotne obdelave in stopnje pečenosti. Pri tem velja, da način toplotne obdelave in stopnja pečenosti statistično značilno vpliva na vsebnost skupnih HAA tako pri običajnem ($p \leq 0,05$) kot tudi pri *n*-3–obogatenem mesu ($p \leq 0,01$). Pri običajnem in *n*-3–obogatenem mesu se je največ posameznih in skupnih HAA tvorilo pri podaljšanem pečenju na žaru ($T_s = 95$ °C) (običajno: 63,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$; *n*-3: 47,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), kljub temu da je bila izguba mase v tem primeru manjša (običajno: 35 %; *n*-3: 32 %) kot pri ostalih dveh postopkih (pečica IR – običajno: 44 %, *n*-3: 40 %; pečica – običajno: 43 %, *n*-3: 38 %) (preglednica 18). Kljub ugotovljenim razlikam v izgubi mase med različno pripravljenimi vzorci, pa vpliv načina toplotne obdelave na izgubo mase statistično ni značilen. Pri pečenju na žaru velja, da je meso in s tem prekursorji HAA v neposrednem stiku z grelno ploščo, kar pomeni, da se vsebnost vode na površini zmanjša, nasprotno pa se poveča koncentracija prekursorjev, odgovornih za tvorbo HAA. Bistveno manj skupnih HAA se je tvorilo pri pečenju v običajni pečici (običajno: 3,38 $\mu\text{g}/\text{kg}$; *n*-3: 3,53 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in pečici IR (običajno: 3,86 $\mu\text{g}/\text{kg}$; *n*-3: 1,72 $\mu\text{g}/\text{kg}$), in sicer pri manjši stopnji pečenosti ($T_s = 82$ °C). Razlog je v tem, da je v primeru pečenja v pečici in pečici IR površina na volumen relativno manjša kot pri pečenju na žaru.

Pri vseh treh postopkih lahko ugotovimo, da se pri višji stopnji pečenosti ($T_s = 95$ °C), kar pri enakih pogojih pečenja pomeni daljši čas toplotne obdelave, tvori več skupnih in posameznih HAA kot pri manjši stopnji pečenosti ($T_s = 82$ °C), vendar razlike statistično niso značilne. Tako se pri podaljšanem pečenju (do $T_s = 95$ °C) v pečici IR vsebnost skupnih

HAA poveča kar za faktor 8,5 (običajno) oz. 8,3 (*n*-3) v primerjavi s pečenjem do $T_s = 82\text{ °C}$. Do povečanja vsebnosti skupnih HAA pri večji stopnji pečenosti pride tudi pri pečenju v pečici, in sicer za 199 % (običajno) oz. 210 % (*n*-3) ter pečenju na žaru, kjer pride do 104 % (običajno) oz. 113 % (*n*-3) povečanja.

Pokazal se je tudi vpliv stopnje pečenosti na izgubo mase pri vseh treh postopkih toplotne obdelave, in sicer je pri višji stopnji pečenosti ($T_s = 95\text{ °C}$) izguba praviloma značilno večja kot pri krajšem času toplotne obdelave ($T_s = 82\text{ °C}$) (preglednica 19), kar se odraža tudi v večji vsebnosti HAA (preglednica 18).

Preglednica 19: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR) in stopnje pečenosti ($T_s = 82$ in 95 °C) na izgubo mase (%) med toplotno obdelavo filejev piščancev, krmljenih s krmo z dodatkom lanenega semena (*n*-3 obogatitev) in brez dodatka (običajno)

Table 19: Effects of type of thermal treatment (two-platted grill, oven and IR oven) and degree of doneness (82 and 95 °C) on weight loss (%) of after thermal treatment chicken file, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n*-3 enriched) and without (control)

Obogatitev običajen					<i>n</i> -3				
T_s/TO	pečica IR	pečica	žar	$p_{TO}(SEM)$	pečica IR	pečica	žar	$p_{TO}(SEM)$	
95 °C	44 ^a	43 ^a	35	nz(6)	40	38 ^a	32	nz(6)	
82 °C	29 ^b	26 ^b	30	nz(2)	28	24 ^b	29	nz(4)	
$p_s(SEM)$	* (3)	* (5)	nz(6)		nz(5)	* (4)	nz(6)		

značilnost vpliva: * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_{TO} , statistična verjetnost vpliva načina toplotne obdelave; p_s , statistična verjetnost vpliva stopnje pečenosti; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med stopnjami pečenosti)

levels of significance: * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_{TO} , statistical probability of thermal types treatment; means with a different superscript within columns (^{a,b}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different degree of doneness)

Pri običajnem in *n*-3–obogatenem mesu, obdelanem s tremi načini toplotne obdelave in pri dveh stopnjah pečenosti ($T_s = 82$ oz. 95 °C), so preskuševalci ovrednotili tudi senzorične lastnosti. Iz preglednice 20 je razvidno, da stopnja pečenosti značilno ($p \leq 0,001$) vpliva na teksturo in barvo filejev. Pečenje do višje stopnje pečenosti ($T_s = 95\text{ °C}$) v pečici in pečici IR pri običajnem in *n*-3–obogatenem mesu povzroči poslabšanje teksture v primerjavi z nižjo stopnjo pečenosti ($T_s = 82\text{ °C}$), pa tudi pojav bolj intenzivne barve oz. zažgane površine filejev. Stopnja pečenosti značilno ($p \leq 0,01$ oz. $p \leq 0,001$) vpliva tudi na pojav tujih arom pri pečenju filejev v pečici IR in na žaru. Preskuševalci so zaznali bistveno bolj izraženo grenko aromo pri višji kot pri nižji stopnji pečenosti.

Ugotovili smo tudi značilen ($p \leq 0,01$) vpliv *n*-3–obogatitve (priloga B.2) na pojav tujih vonjev in arom. Predvsem pri pečenju v pečici in pečici IR pri nižji stopnji pečenosti ($T_s = 82\text{ °C}$) so preskuševalci pri *n*-3–obogatenem mesu zaznali izrazite tuje vonje in aromo po lanu. Nasprotno pa so pri pečenju na žaru pri višji stopnji pečenosti (95 °C) zaznali predvsem tuje vonje in arome po zažganem, ki so prekrili tudi neželeno aromo po lanu in je v omenjenem primeru niso zaznali.

Preglednica 20: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR) in stopnje pečenosti ($T_s = 82$ in 95 °C) na senzorične lastnosti toplotno obdelanih filejev piščancev, krmljenih z dodatkom mletega lanenega semena ($n-3$) in brez dodatka (običajno)

Table 20: Effects of type of thermal treatment (two-platted grill, oven and IR oven) and degree of doneness (82 and 95 °C) on sensory properties after thermal treatment of chicken fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed ($n-3$ enriched) and without (control)

obogatitev običajen					$n-3$				
način TO lastnost	T_s	IR	pečica	žar	$p_{TO}(SEM)$	IR	pečica	žar	$p_{TO}(SEM)$
barva	95 °C	5,5 ^{aA}	4,5 ^{aB}	5,1 ^{AB}	*(0,8)	5,7 ^{aA}	4,8 ^{aB}	5,2 ^{AB}	nz(0,8)
	82 °C	3,8 ^{bA}	3,0 ^{bC}	5,1 ^B	*** (0,5)	3,8 ^{bB}	2,8 ^{bC}	5,0 ^A	*** (0,5)
	$p_s(SEM)$	*** (0,6)	*** (0,7)	nz(0,7)		*** (0,9)	*** (0,8)	nz(0,4)	
tekstura	95 °C	5,5 ^{aA}	5,2 ^{aA}	4,7 ^B	** (0,4)	5,4 ^{aA}	5,3 ^{aA}	4,7 ^B	*** (0,4)
	82 °C	4,0 ^b	4,2 ^b	4,4	nz(0,3)	4,4 ^b	4,3 ^b	4,4	nz(0,3)
	$p_s(SEM)$	*** (0,4)	*** (0,3)	nz(0,4)		*** (0,4)	*** (0,3)	nz(0,5)	
tuji vonji	95 °C	1,4 ^B	1,3 ^B	1,8 ^{bA}	*(0,4)	1,3 ^b	1,4 ^b	1,4	nz(0,3)
	82 °C	1,5 ^B	1,5 ^B	2,8 ^{aA}	*** (0,5)	2,3 ^{aA}	2,0 ^{aA}	1,3 ^B	*** (0,4)
	$p_s(SEM)$	nz(0,5)	nz(0,3)	** (0,5)		*** (0,3)	** (0,3)	nz(0,3)	
tuje arome	95 °C	1,6 ^A	1,5 ^{aA}	2,4 ^{aB}	** (0,6)	1,3	1,6	1,9 ^a	nz(0,6)
	82 °C	1,1	1,0 ^b	1,3 ^b	nz(0,3)	1,8 ^A	1,5 ^{AB}	1,2 ^{bB}	*(0,4)
	$p_s(SEM)$	nz(0,5)	** (0,3)	*** (0,6)		nz(0,5)	nz(0,5)	*** (0,7)	

značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz - $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_{TO} , statistična verjetnost vpliva načina toplotne obdelave; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med načini toplotne obdelave); p_s , statistična verjetnost vpliva stopnje pečenosti; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b}) se statistično značilno razlikujejo $p \leq 0,05$; značilnost razlik med stopnjami pečenosti)

levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz - $p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_{TO} , statistical probability of thermal types treatment; means with a different superscript within rows (^{A, B, C}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between different different type of thermal treatment); means with a different superscript within columns (^{a, b}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between different degree of doneness)

4.2.2 Vpliv rastlinskih ekstraktov in nosilcev ekstraktov na tvorbo HAA v piščančjih sekljancih

Na podlagi dobljenih rezultatov predposkusa in trendov priprave sekljancev smo se odločili, da bomo vsebnost HAA v piščančjih sekljancih določali po pečenju na dvoploščnem žaru do $T_s = 82$ °C, kar je tudi v praksi najpogostejši način priprave tovrstnega živila.

Zmletemu piščančjemu fileju, običajnemu in $n-3$ -obogatenemu, smo dodali različne ekstrakte, ki smo jih predhodno vezali na dva različna nosilca, sol in škrob. Ta dva nosilca se tudi sicer v praksi zelo pogosto uporabljata. Poleg vloge nosilca ima dodatek soli oz. škroba pomembno vlogo tudi pri vezavi vode. Ključna je uporaba snovi, ki vežejo vodo, predvsem v primeru zmlatega mesa (tudi sekljancev). Pri razdevanju mesa pride do porušanja celične strukture mesa in s tem do povečanega prehajanja vode na površino.

Dodatek soli oz. škroba v tem primeru veže vodo in tako zmanjša prehajanje vode in prekursorjev HAA na površino, kar posledično pomeni zmanjšano tvorbo HAA. Ta predvidevanja so potrdili tudi rezultati analiz na vsebnost posameznih in skupnih HAA v piščančjih sekljancih, ki so predstavljeni v preglednici 21 (povzeto po prilogi B).

Preglednica 21: Vpliv dodatka različnih rastlinskih ekstraktov in nosilcev (sol, škrob) teh ekstraktov na vsebnost ($\mu\text{g}/\text{kg}$) nekaterih posameznih in skupnih HAA v pečenih sekljancih iz mesa piščancev, krmljenih z dodatkom mletega lanenega semena ($n-3$) in brez dodatka (običajno)

Table 21: Effects of different plant extract addition and different carriers (salt, starch) of those extracts on content ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of some individual and total HAA of roasted patties, originated from chicken fed with ground whole flaxseed ($n-3$ enriched) and without (control)

HAA	Obogatitev običajen				$n-3$		
	Ekstrakt/nosilec	škrob	sol	$p_N(\text{SEM})$	škrob	sol	$p_N(\text{SEM})$
MeIQx	kontrola	1,18 ^{bAC}	0,73 ^D	nz(0,61)	2,47 ^a	0,68 ^{bc}	* (0,80)
	BR1	1,18 ^{bbAC}	13,48 ^{aA}	*** (0,21)	1,32 ^b	17,11 ^{aA}	** (1,01)
	BR3	1,27 ^{bbAC}	7,84 ^{aBC}	* (1,21)	0,89 ^b	13,43 ^{aA}	** (1,14)
	BR4	1,55 ^{ba}	10,75 ^{aBA}	* (0,99)	0,95	4,33 ^{CB}	nz(0,88)
	LB1	0,72 ^{BC}	2,13 ^{CD}	nz(2,14)	1,04	13,68 ^A	nz(3,50)
	LB2	1,26 ^{BAC}	5,44 ^{BCD}	nz(5,44)	0,98	4,24 ^{CB}	nz(2,69)
	LB3	0,94 ^{BAC}	1,83 ^{CD}	nz(1,22)	1,32	2,43 ^{CB}	nz(0,35)
	LB4	0,70 ^{bBC}	1,77 ^{aD}	* (0,18)	0,91	2,53 ^{CB}	nz(0,55)
	LB5	1,24 ^{BAC}	1,03 ^D	nz(0,28)	0,70 ^b	1,86 ^{aCB}	** (0,11)
	LB6	–	1,85 ^{CD}	–	–	1,60 ^C	–
	ROŽ1	0,85 ^{BAC}	3,53 ^{CD}	nz(3,53)	1,24	0,24 ^C	nz(0,32)
	ROŽ2	1,32 ^{BA}	4,77 ^{CD}	nz(8,81)	0,72	6,59 ^B	nz(2,94)
	ROŽ3	0,74 ^{BC}	3,01 ^{CD}	nz(1,01)	0,71 ^b	4,14 ^{aCB}	* (0,75)
	ROŽ4	0,52 ^{bc}	3,72 ^{aCD}	* (0,61)	0,94	4,32 ^{CB}	nz(0,79)
	$p_R(\text{SEM})$	*(0,28)	** (2,53)	–	nz(0,21)	*** (2,01)	–
	PhIP	kontrola	3,21 ^{ba}	29,31 ^A	* (14,29)	1,36 ^{baBA}	55,73 ^{aBA}
BR1		1,48 ^{BA}	23,57 ^A	nz(9,74)	1,66 ^{ba}	30,02 ^{aDC}	* (3,32)
BR3		2,08 ^{bbBA}	17,84 ^{aA}	* (2,86)	0,65 ^{bb}	28,58 ^{aDC}	* (3,59)
BR4		3,06 ^{ba}	27,23 ^{aA}	** (1,53)	0,56 ^{bb}	19,15 ^{aD}	* (2,93)
LB1		1,31 ^{bbBA}	26,89 ^{aA}	* (3,05)	0,57 ^B	69,20 ^A	nz(18,82)
LB2		1,72 ^{bbBA}	35,13 ^{aA}	** (1,27)	1,31 ^{BA}	18,23 ^D	nz(5,74)
LB3		2,60 ^{BA}	18,74 ^A	nz(9,47)	1,63 ^{ba}	28,91 ^{aDC}	*** (0,72)
LB4		1,02 ^{bb}	12,23 ^{aA}	** (1,04)	1,31 ^{bbBA}	20,34 ^{aD}	* (3,02)
LB5		2,26 ^{BA}	9,49 ^A	nz(3,94)	0,89 ^{bbBA}	22,09 ^{aD}	** (2,91)
LB6		–	19,15 ^A	–	–	27,34 ^{DC}	–
ROŽ1		0,90 ^{bb}	21,72 ^{aA}	* (2,37)	1,41 ^{bbBA}	17,03 ^{aD}	* (2,05)
ROŽ2		2,08 ^{BA}	36,68 ^A	nz(8,81)	1,32 ^{BA}	45,60 ^{BC}	nz(12,28)
ROŽ3		1,30 ^{bbBA}	33,28 ^{aA}	* (5,85)	0,75 ^{bb}	31,33 ^{aDC}	* (4,91)
ROŽ4		0,78 ^{bb}	11,83 ^{aA}	* (2,46)	0,94 ^{bbBA}	26,03 ^{aDC}	* (3,03)
$p_R(\text{SEM})$		** (0,50)	* (8,07)	–	* (0,32)	** (8,87)	–
skupni HAA		kontrola	5,97 ^{bbA}	34,70 ^{aBA}	* (16,17)	4,59 ^{ba}	64,35 ^{aB}
	BR1	3,65 ^{BDC}	43,83 ^{BA}	nz(10,36)	4,60 ^{ba}	54,76 ^{aCB}	** (4,60)
	BR3	4,91 ^{bbDAC}	30,24 ^{aBA}	* (4,83)	2,59 ^{bbC}	49,05 ^{aCBD}	* (5,66)
	BR4	7,11 ^{ba}	45,14 ^{aA}	** (1,19)	2,10 ^{bc}	28,33 ^{aCD}	* (4,21)
	LB1	2,94 ^{bbDC}	33,92 ^{aBA}	*** (0,94)	2,48 ^{BC}	96,7 ^A	nz(26,27)
	LB2	4,13 ^{bbDAC}	46,97 ^{aA}	* (7,42)	3,44 ^{BAC}	27,42 ^{CD}	nz(9,31)
	LB3	5,56 ^{BAC}	24,10 ^{BA}	nz(11,98)	3,98 ^{bbBAC}	36,26 ^{aCBD}	** (1,35)
	LB4	2,47 ^{bbDC}	16,81 ^{aBA}	** (1,39)	3,19 ^{bbBAC}	27,10 ^{aCD}	* (3,82)
	LB5	4,99 ^{BDAC}	12,53 ^B	nz(4,54)	2,22 ^{bc}	27,65 ^{aCD}	** (3,33)
	LB6	–	24,77 ^{BA}	–	–	33,38 ^{CBD}	–
	ROŽ1	2,63 ^{bbDC}	29,22 ^{aBA}	* (6,11)	4,23 ^{bbBA}	20,24 ^{aD}	* (1,89)
	ROŽ2	5,19 ^{BDAC}	48,23 ^A	nz(11,84)	2,84 ^{BAC}	59,96 ^B	nz(17,62)
	ROŽ3	2,90 ^{bbDC}	42,53 ^{aBA}	* (8,43)	2,32 ^{bc}	41,31 ^{aCBD}	* (6,86)
	ROŽ4	1,88 ^{bd}	18,62 ^{aBA}	* (3,73)	2,87 ^{bbBAC}	35,62 ^{aCBD}	* (4,43)
	$p_R(\text{SEM})$	*** (0,90)	** (10,20)	–	* (0,66)	** (12,44)	–

kontrola – dodan samo nosilec (sol, škrob) brez ekstrakta; BR1 – brinove jagode (Volče, 550 m n.m.v.), BR3 – brinove jagode (kupljene)
BR3 - brinove jagode (Vremščica, 1000 m n.m.v., LB1 – lubje črnega bora (območje Kopra), LB2 – lubje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB3 – lubje črnega bora (Volče, 550 m n.m.v.), LB4 – lubje rdečega bora, LB5 – lubje zelenega bora, LB6 – lubje pinje (območje

Kopra), ROŽ1 – svež rožmarin (domač), ROŽ2 – suh rožmarin (Kotanyi), ROŽ3 – suh rožmarin (Maestro), ROŽ4 – svež rožmarin (območje Kopra); značilnost vpliva: ** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, $nz - p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_N – statistična verjetnost vpliva nosilca; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med soljo ali škrobom kot nosilcem rastlinskega ekstrakta); p_R – statistična značilnost vpliva dodatka rastlinskega ekstrakta; srednje vrednosti z različno črko (^{A,B,C,D}) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo (značilnost razlik med različnimi dodanimi rastlinskimi ekstrakti)

control – carrier (salt, starch) without extracts; BR1 – juniper berries (Volče, 550 m n.m.v.), BR3 – juniper berries, BR4 – juniper berries (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB1 – black pine bark (Koper), LB2 – black pine bark (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB3 – black pine bark (Volče, 550 m n.m.v.), LB4 – red pine bark, LB5 – green black pine bark, LB6 – pinus bark (Koper), ROŽ1 – fresh rosemary (home), ROŽ2 – dry rosemary (Kotanyi), ROŽ3 – dry rosemary (Maestro), ROŽ4 – fresh rosemary (Koper); levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, $nz - p > 0.05$ statistically not significant; p_N , statistical probability of carrier of plant extracts; p_R , statistical probability of addition of different plant extracts; SEM, standard error of mean; means with a different superscript within columns (^{a,b}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between salt and starch carriers); means with a different superscript within rows (^{A,B,C,D}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different plant extracts).

Iz preglednice 21 je razvidno, da izbor nosilca (sol, škrob) ekstrakta pomembno vpliva na tvorbo HAA pri običajnih in *n-3*-obogatenih sekljancih. V primeru uporabe škroba kot nosilca ekstraktov (tudi v primeru brez vezanih ekstraktov, označeno kot »kontrola«) je obseg tvorbe posameznih in skupnih HAA bistveno manjši kot pri uporabi soli, tudi za faktor 10-20. Zmanjšano tvorbo HAA v primeru uporabe škroba kot nosilca povezujemo z dejstvom, da ima škrob večjo sposobnost vezanja vode kot sol. To potrjujejo tudi rezultati prikazani v prilogi B.5, iz katere je razvidno, da vrsta nosilca vpliva tudi na izgubo mase med pečenjem sekljancev. Izguba mase je v primeru uporabe škroba kot nosilca manjša kot v primeru soli, in se giblje od 16 do 24 % za običajne ter od 15 do 25 % za *n-3*-obogatene sekljance. V primeru uporabe soli pa je izguba mase 21 do 34 % za običajne in 21 do 31 % za *n-3*-obogatene sekljance.

Na vsebnost HAA v običajnih in *n-3*-obogatenih sekljancih vpliva dodatek različnih ekstraktov, saj se je vsebnost skupnih HAA glede na sekljance brez dodanega ekstrakta zmanjšala v primeru uporabe obeh nosilcev (sol, škrob) (preglednica 21). Pri tem smo uporabili enake koncentracije ekstraktov iz različnih vrst rožmarina, brinovih jagod in lubja bora. Pokazalo se je, da dodatek ekstraktov močnejše vpliva na zmanjšanje vsebnosti HAA glede na sekljance brez dodanega ekstrakta (kontrola) predvsem pri *n-3*-obogatenih sekljancih. V tem primeru se je vsebnost HAA glede na sekljance brez dodanega ekstrakta zmanjšala za 6,8 do 69 % ob dodatku ekstrakta rožmarina, 44 do 58 % v primeru ekstrakta lubja bora oz. 15 do 48 % v primeru dodanega ekstrakta brinovih jagod, vezanih na sol. V primeru, ko so bili isti ekstrakti vezani na škrob, se vsebnost skupnih HAA v *n-3*-obogatenih sekljancih zmanjša za 0 do 54 % pri ekstraktu brinovih jagod, 13 do 52 % v primeru lubja bora oz. 8 do 49 % v primeru uporabe ekstrakta rožmarina. V primeru običajnih sekljancev lahko vidimo, da je vpliv dodanega ekstrakta statistično zelo visoko značilen v primeru škroba oz. visoko značilen v primeru uporabe soli kot nosilca. Pri običajnih sekljancih pa na splošno velja, da dodatek ekstrakta zmanjša vsebnost skupnih HAA, čeprav se pojavljajo med temi ekstrakti tudi takšni, katerih dodatek poveča vsebnost HAA glede na sekljance brez dodanega ekstrakta.

Podobno kot pri predposkusu lahko tudi v primeru sekljancev vrednotimo vpliv *n-3* obogatitve na tvorbo HAA (priloga B.4), saj smo ugotovili razlike med običajnimi in *n-3*-obogatenimi sekljanci. V sekljancih, kjer smo kot nosilec uporabili škrob, je bil vpliv *n-3*-obogatitve pri nekaterih ekstraktih statistično značilen (LB3, ROŽ2) oz. statistično visoko značilen (BR3, BR4, LB5), pri ostalih pa statistično neznačilen ($p > 0,05$), kar je posledica

velikih standardnih odklonov. V primeru uporabe škroba kot nosilca lahko vidimo, da se pri $n-3$ -obogatenih sekljancih z vsemi ekstrakti tvori manjša količina HAA kot pri običajnih sekljancih. To z vidika vpliva $n-3$ -obogatitve na vsebnost HAA pomeni, da je uporaba škroba kot nosilca boljše izbira. Če kot nosilec uporabimo sol, je učinek ravno nasproten, saj se pri $n-3$ -obogatenih sekljancih v večini primerov tvori več HAA kot pri običajnih sekljancih, čeprav vpliv $n-3$ -obogatitve pri teh sekljancih statistično ni značilen ($p > 0,05$). Izjema so sekljanci brez dodanih ekstraktov, kjer pa je vpliv $n-3$ -obogatitve statistično značilen.

4.3 SKLOP III: MARINADE Z EKSTRAKTOM BRINOVIH JAGOD IN NJIHOV VPLIV NA TVORBO PRODUKTOV OKSIDACIJE IN HAA V PIŠČANČJIH MINI FILEJIH, OBOGATENIH Z $n-3$ VNMK

4.3.1 Instrumentalno merjenje barve površine

Z namenom, da bi ugotovili morebitni vpliv skladiščenja na spremembo barve, smo ob vsakem vzorčenju (1., 5. in 9. dan skladiščenja) instrumentalno izmerili barvo mariniranih mini filejev s kromametrom. Zadnji dan smo opravili še meritve na dodatnih vzorcih, ki so bili vakuumsko zapakirani.

Pri tem smo ugotovili, da čas skladiščenja bistveno ne vpliva na vrednost L^* oz. svetlost barve običajnih in $n-3$ -obogatenih mini filejev pri posamezni vrsti marinade. Nasprotno pa čas skladiščenja vpliva na vrednost a^* , ki vrednoti intenziteto rdeče barve. V primeru običajnih mini filejev (ko na noben nosilec ni vezan ekstrakt) daljši čas skladiščenja povzroči povečanje vrednosti a^* , kar pomeni večjo intenziteto rdeče barve. V primeru marinade, kjer je ekstrakt brinovih jagod vezan na škrob oz. sol, pa se intenziteta rdeče barve na običajnih in $n-3$ -obogatenih mini filejih zmanjša. Podrobni rezultati teh meritev so prikazani v prilogi C.1, v kateri je predstavljen tudi vpliv $n-3$ -obogatitve na instrumentalno barvo mariniranih mini filejev po določenem času skladiščenja. Na splošno $n-3$ -obogatitev ne vpliva značilno na instrumentalno izmerjene vrednosti barve, čeprav so se pojavile razlike v vrednosti a^* na malih filejih brez ekstrakta vezanega na nosilce (kontrola). V vseh teh primerih je vrednost a^* pri $n-3$ -obogatenih mini filejih večja kot pri običajnih mini filejih, kar je ugodno, saj to pomeni, da $n-3$ -obogatitev poveča intenziteto rdeče barve.

V sklopu instrumentalnega merjenja barve površine smo obravnavali tudi vpliv posameznih nosilcev brinovega ekstrakta med devetdnevnim skladiščenjem. Rezultati so predstavljeni v prilogi C.2. Pri tem lahko pri običajnih mini filejih ugotovimo značilen vpliv ($p \leq 0,01$) vrste nosilca na vrednost a^* že prvi dan skladiščenja. V tem primeru je vrednost a^* manjša v primerjavi z marinado z dodanimi nosilci, vendar brez ekstrakta (kontrola). Podobno velja za vpliv vrste nosilca na vrednost L^* pri $n-3$ -obogatenih mini filejih prvi dan skladiščenja, saj dodani nosilci zmanjšajo vrednosti L^* glede na kontrolo. Prav tako pa različni nosilci zmanjšajo tudi a^* vrednost pri $n-3$ -obogatenih mini filejih deveti dan skladiščenja v primerjavi s kontrolo.

Poleg meritev, opravljenih na mini filejih, ki so bili pakirani v modificirano atmosfero, smo deveti dan skladiščenja izmerili tudi barvo površine mini filejev, ki so bili vakuumsko pakirani. Iz priloge C.19 je razvidno, da $n-3$ -obogatitev pri tem načinu pakiranja značilno ($p \leq 0,001$) vpliva predvsem na vrednost a^* , izmerili smo bistveno večje vrednosti pri $n-$

3–obogatenih mini filejih v primerjavi z običajnimi mariniranimi mini fileji. Ob tem smo prišli tudi do ugotovitve, da je vrednost a^* pri n –3–obogatenih vakuumsko pakiranih mini filejih deveti dan bistveno večja kot pri pakiranju v modificirano atmosfero. Pri tem je značilen ($p \leq 0,001$) tudi vpliv vrste nosilca brinovega ekstrakta na vrednost a^* .

4.3.2 Število tiobarbiturne kisline (TBK)

Število TBK je pokazatelj stopnje oksidacije oz. žarkosti maščob in živil, ki vsebujejo maščobe. Večje število TBK pomeni večjo stopnjo oksidacije, kar pa ne pomeni nujno tudi spremembe senzoričnih lastnosti.

Preglednica 22: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (n –3–obogatitve) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C na parameter oksidacije lipidov (število TBK) presnih mariniranih piščančjih mini filejev, pakiranih v modificirano atmosfero

Table 22: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (n –3 enriched) and storage time at temperature of (4 ± 1) °C on lipid oxidation parameter (TBARs) of raw marinated chicken inner fillets, packed in modified atmosphere

Nosilec	kontrola			olja			škrob			sol		
	običajen	n –3	p_E (SEM)	običajen	n –3	p_E (SEM)	običajen	n –3	p_E (SEM)	običajen	n –3	p_E (SEM)
1	0,43	0,24 ^c	nz(0,05)	0,23 ^b	0,21 ^c	nz(0,01)	0,26	0,28 ^a	nz(0,02)	0,14 ^b	0,18 ^b	*(0,01)
5	0,30 ^B	0,39 ^{Ab}	*(0,01)	0,27 ^b	0,34 ^b	nz(0,02)	0,22	0,18 ^b	nz(0,02)	0,18 ^b	0,23 ^a	nz(0,01)
9	0,38 ^A	0,30 ^{Ba}	*(0,02)	0,36 ^a	0,43 ^a	nz(0,02)	0,21	0,23 ^a	nz(0,04)	0,25 ^a	0,21 ^{ab}	nz(0,02)
p_D (SEM)	nz(0,04)	** (0,01)		*(0,03)	*** (0,01)		nz(0,03)	*(0,02)		*(0,02)	*(0,01)	

kontrola – samo nosilci (olja, škrob, sol) brez dodanega brinovega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_E , statistična verjetnost vpliva n –3–obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi mini fileji in n –3–obogatenimi mini fileji); p_D , statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz – $p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_E , statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A,B}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between control and n –3–enriched chicken inner fillets); p_D , statistical probability of storage time effect; means with a different superscript within columns (^{a,b,c}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between times of storage)

Meso, ki je obogateno z n –3 MK, je zaradi večjega deleža VNMK bolj podvrženo oksidacijskim procesom, zato smo pričakovali, da se bo število TBK s časom skladiščenja pri n –3–obogatenih v primerjavi z običajnimi mini fileji bistveno povečalo.

Znotraj posameznih skupin glede na vrsto nosilca ekstrakta (preglednica 22) lahko vidimo, da je vpliv n –3 obogatitve praviloma statistično neznačilen ($p > 0,05$), izjema je kontrolna marinada (brez dodanega brinovega ekstrakta). Peti dan je število TBK večje pri n –3–obogatenih mini filejih, deveti dan pa pri običajnih mini filejih. Iz preglednice 22 lahko tudi povzamemo, da število TBK pri običajnih in n –3–obogatenih mini filejih s časom skladiščenja praviloma narašča, vendar na osnovi teh rezultatov ne moremo trditi, da je to bistveno bolj izrazito v primeru n –3–obogatenih mariniranih mini filejev.

Najverjetnejši razlog, da se število TBK n –3–obogatenih mariniranih mini filejev glede na običajne marinirane mini fileje s časom skladiščenja bistveno ne razlikuje, je najbrž v dodatku brinovega ekstrakta in njegovega antioksidativnega delovanja.

To lahko sklepamo na osnovi rezultatov iz preglednice 23, saj se je število TBK (glede na kontrolno marinado) pri običajnih in *n-3*-obogatenih mini filejih zmanjšalo v vseh primerih, ko je bil marinadam dodan ekstrakt brinovih jagod. Najmanjše število TBK in s tem najnižja stopnja oksidacije je bila pri običajnih in *n-3*-obogatenih mini filejih dosežena v primeru, ko je bil ekstrakt brinovih jagod vezan na sol oz. škrob

Preglednica 23: Vpliv različnih nosilcev (kontrola, oje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na parameter oksidacije lipidov (TBK) presnih mariniranih mini filejev piščancev, krmljenih z dodatkom mletega lanenega semena (*n-3*-obogatitev) in brez dodatka (običajno), pakiranih v modificirani atmosferi, med devetdnevnim skladiščenjem in pri temperaturi (4 ± 1) °C

Table 23: Effect of different juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on lipid oxidation parameter (TBARS) of marinated raw chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n-3* enriched) and without (control), packed in modified atmosphere, during 9 days of storing at temperature of (4 ± 1) °C

Obogatitev običajen	<i>n-3</i>			
	Nosilec/ dan	kontrola olje	škrob sol	p_N (SEM)
1	0,43 ^A	0,23 ^{BC}	0,26 ^B	0,14 ^C ** (0,04)
5	0,30 ^A	0,27 ^{AB}	0,22 ^{BC}	0,18 ^C * (0,02)
9	0,38 ^A	0,36 ^A	0,21 ^B	0,25 ^B * (0,03)

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez brinovega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, $nz - p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_N , statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod)

control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, $nz - p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_N , statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between different juniper berries extract carriers)

Število TBK smo vzporedno določali tudi na vakuumsko pakiranih mariniranih mini filejih, ki smo jih skladiščili pri enakih pogojih in vse analize na njih opravili samo zadnji (deveti) dan. Pri tem smo proučevali vpliv *n-3*-obogatitve in uporabe različnih nosilcev na število TBK. Predvidevali smo, da vakuumsko pakiranje vpliva na zmanjšanje števila TBK. Pri presnih mini filejih lahko ugotovimo, podobno kot pri tistih pakiranih v modificirano atmosfero, da *n-3*-obogatitev statistično ne vpliva na število TBK. Kljub temu lahko iz preglednice 24 razberemo, da obstajajo razlike v številu TBK med *n-3*-obogatenimi in običajnimi mini fileji pri vseh vrstah marinad. Pri tem se je ponovno pokazal pozitiven učinek dodanega brinovega ekstrakta, saj se je število TBK v primeru vseh marinad zmanjšalo glede na kontrolno marinado, kateri ni bil dodan brinov ekstrakt. Učinek ekstrakta je bil zelo podoben pri vseh marinadah, še posebej izrazit v skupni *n-3*-obogatenih mini filejev.

Število TBK smo določili tudi na mariniranih mini filejih (vakuumsko pakiranih), ki smo jih po devetdnevnem skladiščenju toplotno obdelali na dvoploščnem žaru. Toplotna obdelava vpliva na povečanje števila TBK v primerjavi s presnim mesom, saj povzroči porušenje celične strukture in s tem omogoči lažji dostop prooksidantov do VNMK. Vpliv toplotne obdelave na število TBK potrjujejo tudi rezultati prikazani v preglednici 24, saj se število TBK pri toplotno obdelanih običajnih in *n-3*-obogatenih mini filejih močno poveča glede na presne marinirane mini fileje. Poudariti je potrebno, da je učinek toplotne obdelave še posebej izrazit pri *n-3*-obogatenih mini filejih, saj se pri tem števila TBK pri toplotno

obdelanih glede na presne povečajo od 185 % v primeru, ko je nosilec škrob pa vse do 375 %, ko se kot nosilec brinovega ekstrakta uporabi olje.

Izkazalo se je, da ima dodatek brinovega ekstrakta v primeru toplotno obdelanih običajnih in *n*-3-obogatenih mini filejev negativen učinek, saj se število TBK pri vseh marinadah poveča glede na kontrolno marinado brez dodanega brinovega ekstrakta. Izjema so marinirani *n*-3-obogateni mini fileji, kjer je bil ekstrakt vezan na škrob oz. sol, saj se je v tem primeru število TBK rahlo zmanjša glede na kontrolno marinado.

Preglednica 24: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3-obogatitev) in različnih nosilcev (kontrola, olje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na oksidacijo lipidov (TBK) v vakuumsko pakiranih mariniranih presnih in na dvoploščnem žaru (temperatura plošč 220 °C, 5 min) toplotno obdelanih mini filejih po devetih dneh skladiščenja pri temperaturi (4 ±1) °C

Table 24: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and different juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on lipid oxidation (TBARs) of vacuum packed raw and roasted chicken inner fillets prepared on two-platted grill (plate temperature 220 °C, 5 min), on 9th day of storing at (4 ±1) °C

TBK	Obogatitev	Nosilec				p_N (SEM)
		kontrola	olje	škrob	sol	
na presnih	običajen	0,22	0,20	0,17	0,19	nz(0,00)
	<i>n</i> -3	0,24 ^A	0,16 ^B	0,13 ^B	0,15 ^B	** (0,01)
	p_E (SEM)	nz(0,01)	nz(0,03)	nz(0,01)	nz(0,02)	
na pečenih	običajen	0,23 ^{bC}	0,39 ^{bB}	0,47 ^A	0,45 ^{AB}	** (0,03)
	<i>n</i> -3	0,48 ^{ab}	0,76 ^{aA}	0,37 ^B	0,41 ^B	** (0,06)
	p_E (SEM)	** (0,02)	* (0,05)	nz(0,03)	nz(0,07)	

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez brinovega ekstrakta; značilnost vpliva: ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_N , statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B,C}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod); p_E , statistična verjetnost vpliva *n*-3-obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n*-3-obogatenimi mini fileji)

control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_N , statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A,B,C}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different juniper berries extract carriers); p_E , statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within columns (^{a,b}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between control and *n*-3-enriched inner fillets)

Marinirane mini fileje pakirane v modificirano atmosfero smo toplotno obdelali s tremi različnimi postopki (žar, pečica, pečica IR) in pri tem ugotovili, da način toplotne obdelave na splošno značilno vpliva na število TBK. Kot najboljši način toplotne obdelave se je pokazalo pečenje na žaru, saj smo pri tem določili najnižje število TBK, tako pri običajnih kot tudi *n*-3-obogatenih mini filejih. Pri tem postopku je bil tudi učinek vseh vrst marinad na zmanjšanje števila TBK največji v primerjavi s kontrolno marinado. Podrobni rezultati so prikazani v prilogi C.3. Poleg tega se je pokazalo, da pečenje na žaru med vsemi postopki toplotne obdelave povzroči najmanjše povečanje števila TBK v primerjavi s presnimi mariniranimi mini fileji po devetdnevem skladiščenju (priloga C.3).

Opravili smo tudi analizo vpliva različnih načinov pakiranja (modificirana atmosfera, vakuum) na oksidacijo lipidov oz. število TBK pri presnih in toplotno obdelanih mini filejih. Rezultati so prikazani v preglednici 25 in potrjujejo našo domnevo, da način pakiranja vpliva na potek oksidacije in s tem na število TBK. Ugotovili smo, da pakiranje

mariniranih mini filejev v vakuum zmanjša stopnjo oksidacije glede na pakiranje v modificirano atmosfero. Posebno učinkovito je vakuumsko pakiranje z vidika zmanjšanja stopnje oksidacije v primeru mariniranih *n*-3–obogatenih mini filejev, saj se število TBK v primerjavi s pakiranjem v modificirano atmosfero zmanjša od 20 % pri kontrolni marinadi pa vse do 68 % v primeru vezave brinovega ekstrakta na olje. V primeru analize toplotno obdelanih mini filejev pa lahko ugotovimo ravno nasproten vpliv pakiranja kot pri presnih, saj so povprečne vrednosti števila TBK večje v primeru pakiranja v vakuum.

Podobno kot pri presnih je tudi tu vpliv načina pakiranja najbolj izrazit pri *n*-3–obogatenih mini filejih, kjer smo v marinadi kot nosilec uporabili olje, vendar v tem primeru je bistveno bolj učinkovito pakiranje v modificirano atmosfero, saj je število TBK za 171 % manjše v primerjavi z vakuumom.

Preglednica 25: Vpliv načina pakiranja (modificirano in vakuumsko) na oksidacijo lipidov (TBK) v presnih in na dvoploščnem žaru pečenih (temperatura plošč 220 °C, 5 min) mariniranih običajnih in *n*-3–obogatenih mini filejev po devetdnevem skladiščenju pri temperaturi (4 ±1) °C

Table 25: Effect of packing (modified and vacuum) on lipid oxidation parameter (TBARs) of raw and roasted on two-platted grill (plate temperature 220 °C, 5 min) of control and *n*-3–enriched inner filets, after 9 days of storing at (4 ±1) °C

TBK	obogatitev/ pakiranje	običajen				<i>n</i> -3			
		kontrola	olje	škrob	sol	brez	olje	škrob	sol
na presnih	MAP	0,38 ^a	0,36 ^a	0,21	0,25	0,30 ^a	0,43 ^a	0,23 ^a	0,21
	VP	0,22 ^b	0,20 ^b	0,17	0,19	0,24 ^b	0,16 ^b	0,13 ^b	0,15
	<i>p_p</i> (SEM)	*(0,02)	*(0,03)	nz(0,03)	nz(0,02)	*(0,01)	** (0,01)	*(0,02)	nz(0,02)
na pečenih	MAP	0,19	0,31	0,33 ^b	0,32 ^b	0,36 ^b	0,28 ^b	0,32	0,34
	VP	0,23	0,39	0,47 ^a	0,45 ^a	0,48 ^a	0,76 ^a	0,37	0,41
	<i>p_p</i> (SEM)	nz(0,02)	nz(0,03)	(0,02)	*(0,02)	*(0,02)	** (0,03)	nz(0,04)	nz(0,09)

MAP – pakiranje v modificirano atmosfero; VP – vakuumsko pakiranje; kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez brinovega ekstrakta; značilnost vpliva: ***p* ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, **p* ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – *p* > 0,05 statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_p*, statistična verjetnost vpliva pakiranja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med načini pakiranja)

MAP – modified atmosphere packing; VP – vacuum packing; control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: ***p* ≤ 0.01 highly statistically significant, **p* ≤ 0.05 statistically significant, nz – *p* > 0.05 statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_p*, statistical probability of packing effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (^{a,b}) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of difference between MAP and VP packing)

4.3.3 Holesterol in oksidi holesterola

Holesterol se pod vplivom endogenih in eksogenih dejavnikov oksidira do oksidov holesterola. Stopnja oksidacije holesterola med skladiščenjem in predelavo živila je odvisna predvsem od pogojev skladiščenja in toplotne obdelave (prisotnosti kisika, temperature, svetlobe) ter prisotnosti prostih radikalov in deleža VNМК. Pri tem velja, da sta mehanizma oksidacije lipidov in holesterola medsebojno povezana, saj je znano, da imajo hidroperoksidi, ki nastajajo kot produkti oksidacije VNМК, ključno vlogo pri oksidaciji holesterola.

Glede na to, da *n*-3–obogateni piščančji mini fileji vsebujejo večji delež VNМК, smo pričakovali povečano stopnjo oksidacije holesterola in posledično večjo vsebnost OH glede na običajne mini fileje. To so potrdile analize, katerih podrobni rezultati so predstavljeni v prilogi C.5, medtem ko so v preglednici 26 (povzeta po prilogi C.5) predstavljeni samo rezultati o vsebnosti skupnih OH, holesterola in stopnji oksidacije.

Preglednica 26: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3–obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ±1) °C na vsebnost skupnih oksidov holesterola (OH) in holesterola (mg/kg) ter obseg oksidacije (%) v presnih mariniranih piščančjih mini filejih pakiranih v modificirano atmosfero

Table 26: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and storage time at temperature of (4 ±1) °C on content of total cholesterol oxides (OH) and cholesterol (mg kg⁻¹) as well as rate of oxidation (%) of marinated raw chicken inner fillets, packed in modified atmosphere

OH dan	kontrola			olje			škrob			sol		
	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)
skupni OH												
1	38,44 ^{Aa}	4,21 ^{Bc}	*** (1,37)	39,61 ^{Ab}	25,26 ^{Bb}	*** (1,66)	35,50 ^a	39,58 ^a	nz (1,88)	24,10 ^{Bc}	32,11 ^{Ab}	** (1,42)
5	20,25 ^b	25,07 ^a	nz (8,18)	16,67 ^c	16,72 ^c	nz (0,83)	13,22 ^b	12,24 ^c	nz (0,64)	30,20 ^b	33,45 ^b	nz (1,59)
9	13,06 ^{Bb}	19,47 ^{Ab}	*** (0,83)	84,76 ^{Ba}	137,28 ^{Aa}	*** (5,70)	37,30 ^{Aa}	24,15 ^{Bb}	** (5,61)	46,95 ^{Ba}	58,62 ^{Aa}	** (2,66)
<i>p_D</i> (SEM)	** (7,25)	*** (0,92)		*** (2,74)	*** (4,06)		*** (1,53)	*** (5,24)		*** (1,76)	*** (2,16)	
oksidacija (%)												
1	4,76 ^{Aa}	0,55 ^{Bc}	*** (0,00)	5,21 ^{Ab}	3,30 ^{Bb}	*** (0,00)	4,78 ^{Ba}	4,99 ^{Aa}	*** (0,00)	2,88 ^{Bc}	3,77 ^{Ac}	*** (0,00)
5	2,57 ^b	2,94 ^a	nz (0,93)	2,00 ^{Bc}	2,17 ^{Ac}	*** (0,00)	1,76 ^{Ac}	1,58 ^{Bc}	*** (0,00)	3,56 ^{Bb}	4,18 ^{Ab}	*** (0,00)
9	1,77 ^{Bb}	2,58 ^{Ab}	*** (0,00)	9,60 ^{Ba}	14,21 ^{Aa}	*** (0,00)	4,40 ^{Ab}	3,00 ^{Bb}	** (0,60)	5,92 ^{Ba}	6,56 ^{Aa}	*** (0,00)
<i>p_D</i> (SEM)	** (0,82)	*** (0,00)		*** (0,00)	*** (0,00)		*** (0,00)	*** (0,56)		*** (0,00)	*** (0,00)	
holesterol												
1	768,93	765,61	nz (38,36)	721,02 ^b	740,75	nz (36,55)	706,98 ^b	753,33	nz (36,53)	811,93	819,85	nz (40,79)
5	750,43	827,06	nz (46,42)	818,59 ^a	754,40	nz (39,36)	738,70 ^{ba}	763,05	nz (37,55)	818,59	766,71	nz (39,65)
9	726,60	736,65	nz (36,58)	797,73 ^{ba}	828,78	nz (40,67)	811,10 ^a	778,07	nz (46,66)	745,59	834,41	nz (39,56)
<i>p_D</i> (SEM)	nz (43,79)	nz (38,87)		* (39,01)	nz (38,78)		* (37,68)	nz (45,28)		nz (39,64)	nz (40,38)	

MAP – pakiranje v modificirano atmosfero; VP – vakuumsko pakiranje; kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez brinovega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_E*, statistična verjetnost vpliva *n*-3–obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n*-3–obogatenimi mini fileji); *p_D*, statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

MAP – modified atmosphere packing; VP – vacuum packing; control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_E*, statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A,B}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between control and *n*-3–enriched inner fillets); *p_D*, statistical probability of storage time effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (^{a,b,c}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between times of storage)

Iz preglednice 26 je razvidno, da čas skladiščenja značilno vpliva ($p \leq 0,01$ oz. $p \leq 0,001$) na količino skupnih OH, saj smo deveti (zadnji) dan skladiščenja določili največjo vsebnost skupnih OH tako pri običajnih kot tudi *n*-3–obogatenih mariniranih mini filejih pri vseh vrstah marinad.

Prav tako se je potrdilo, da večji delež VNMK vpliva na povečano stopnjo oksidacije holesterola, saj smo pri *n*-3–obogatenih mariniranih mini filejih določili značilno večjo vsebnost skupnih OH v primerjavi z običajnimi mini fileji. Tako je bila deveti dan skladiščenja količina skupnih OH pri *n*-3–obogatenih mariniranih mini filejih v primerjavi z običajnimi mini fileji večja za 49 % pri kontrolni marinadi, 62 % pri marinadi, kjer je bil nosilec ekstrakta olje, in 25 % v primeru uporabe soli kot nosilca. Nasprotno je imela vezava ekstrakta na škrob pozitiven učinek na količino skupnih OH pri *n*-3–obogatenih mariniranih mini filejih, saj se je količina skupnih OH zmanjšala kar za 65 % glede na običajne mini fileje.

Posledično to pomeni, da na tvorbo OH pomembno vpliva tudi vrsta nosilca ekstrakta oz. ekstrakt sam. Iz preglednice 27 je namreč razvidno, da je po devetdnevem skladiščenju stopnja oksidacije in s tem količina skupnih OH pri običajnih in *n*-3–obogatenih mini filejih statistično značilno najmanjša pri kontrolni marinadi (običajen: 13,06 mg/kg; *n*-3–obogaten: 19,47 mg/kg), ki ne vsebuje brinovega ekstrakta. Nasprotno pa vezava brinovega ekstrakta povzroči statistično značilno ($p \leq 0,001$) povečanje stopnje oksidacije, ki je največje v primeru vezave ekstrakta na olje (običajen: 9,6 %; *n*-3–obogaten: 14,21 %). V tem primeru se je količina skupnih OH glede na kontrolno marinado pri običajnih mini filejih povečala za 6,5-krat oz. za 7,1-krat v skupini *n*-3–obogatenih mini filejev. Med vsemi nosilci ekstrakta je z vidika poteka oksidacije najbolj primeren škrob, saj predvsem pri *n*-3–obogatenih mini filejih povzroči najmanjšo stopnjo oksidacije in najmanjšo količino nastalih skupnih OH glede na kontrolno marinado, in tudi s časom skladiščenja povzroči najmanjše povečanje količine skupnih OH.

Preglednica 27: Vpliv različnih nosilcev (kontrola, olje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na vsebnost skupnih oksidov holesterola (OH) in holesterola (mg/kg) ter obseg oksidacije (%) v presnih običajnih in *n*-3–obogatenih mariniranih piščančjih mini filejih, pakiranih v modificirani atmosferi, med devetdnevem skladiščenjem pri temperaturi (4 ± 1) °C

Table 27: Effect of different juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on content of total cholesterol oxides (OH) and cholesterol (mg kg⁻¹) as well as rate of oxidation (%) of raw marinated chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n*-3 enriched) and without (control), during 9 days of storing in modified atmosphere and at temperature of (4 ± 1) °C

	dan	običajen					p_N (SEM)	<i>n</i> -3					p_N (SEM)
		kontrola	olje	škrob	sol			kontrola	olje	škrob	sol		
skupni OH	1	38,44 ^{AB}	39,61 ^A	35,50 ^B	24,10 ^C		*** (1,75)	4,21 ^D	25,26 ^C	39,58 ^A	32,11 ^B		*** (1,43)
	5	20,25 ^{AB}	16,67 ^B	13,22 ^B	30,20 ^A		*(6,55)	25,07 ^B	16,72 ^C	12,24 ^D	33,44 ^A		*** (1,17)
	9	13,06 ^D	84,76^A	37,30 ^C	46,95 ^B		*** (2,62)	19,47 ^C	137,28^A	24,15 ^C	58,62 ^B		*** (5,51)
oksidacija (%)	1	4,76 ^C	5,21 ^A	4,78 ^B	2,88 ^D		*** (0,00)	0,55 ^D	3,30 ^C	4,99 ^A	3,77 ^B		*** (0,00)
	5	2,57	2,00	1,76	3,56		nz (0,74)	2,94 ^B	2,17 ^C	1,58 ^D	4,18 ^A		*** (0,00)
	9	1,77 ^D	9,60 ^A	4,40 ^C	5,92 ^B		*** (0,00)	2,58 ^C	14,21 ^A	3,00 ^C	6,56 ^B		*** (0,53)
holesterol	1	768,93 ^{AB}	721,02 ^B	706,98 ^B	811,93 ^A		*(37,67)	765,61	740,75	753,33	819,85		nz (38,52)
	5	750,43	818,59	738,70	818,59		nz (43,79)	827,06	754,40	763,05	766,71		nz (38,92)
	9	726,60	797,73	811,10	745,59		nz (38,55)	736,65 ^B	828,78 ^A	778,07 ^{AB}	834,41 ^A		*(45,14)

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez brinovega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_N , statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B,C,D}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod)

control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz – $p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_N , statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A,B,C,D}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between different juniper berries extract carriers)

V nasprotju z OH se količina holesterola praviloma zmanjšuje, in sicer z naraščajočo stopnjo oksidacije oz. količino OH. To je posledica procesa oksidacije holesterola, čeprav v našem primeru ta pojav praviloma statistično ni značilen. Poleg tega lahko ugotovimo (preglednica 26), da razlika v količini holesterola v običajnih in *n*-3–obogatenih mini filejih ni statistično značilna ($p > 0,5$), kar pomeni, da *n*-3–obogatitev ne vpliva na količino holesterola. Podobno velja tudi za vrsto marinade oz. dodatek ekstrakta, ki bistveno ne vplivajo na količino holesterola.

Do podobnih ugotovitev kot pri pakiranju v modificirano atmosfero smo prišli tudi pri vakuumsko pakiranih mariniranih mini filejih, pri katerih smo določali količino holesterola, OH in stopnjo oksidacije samo deveti (zadnji) dan skladiščenja. Rezultati so prikazani v prilogi C.21. Tudi v tem primeru lahko vidimo statistično značilne razlike ($p \leq 0,01$ oz. $p \leq 0,001$) v količini nastalih OH in stopnji oksidacije med običajnimi in *n-3*-obogatenimi mini fileji, pri čemer se je po pričakovanju praviloma pokazal negativen vpliv *n-3*-obogatitve na tvorbo OH. Na količino OH tudi tu pomembno vpliva vrsta marinade, čeprav so se pri vakuumskem pakiranju pokazali nekoliko drugačni učinki ekstrakta oz. marinad v primerjavi s pakiranjem v modificirano atmosfero, kar nazorno prikazuje preglednica 28 (povzeto po prilogi C.22).

Preglednica 28: Vpliv načina pakiranja (modificirano in vakuumsko) na vsebnost skupnih oksidov holesterola (OH) in holesterola (mg/kg) ter obseg oksidacije (%) v presnih običajnih in *n-3*-obogatenih mariniranih piščančjih mini filejih, po devetdnevem skladiščenju pri temperaturi (4 ± 1) °C

Table 28: Effect of packing (modified and vacuum) on content of total cholesterol oxides (OH) and cholesterol (mg kg⁻¹) as well as rate of oxidation (%) of raw marinated chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n-3* enriched) and without (control), after 9 days of storing at (4 ± 1) °C

parameter	Obogatitev običajen					<i>n-3</i>			
	Nosilec/ pakiranje	kontrola	olja	škrob	sol	kontrola	olja	škrob	sol
skupni	MAP	13,06 ^b	84,76 ^a	37,30 ^a	46,95 ^a	19,47 ^a	137,28 ^a	24,15 ^a	58,62^a
OH	VP	25,29 ^a	20,52 ^b	15,29 ^b	20,68 ^b	18,75 ^a	31,22 ^b	24,50 ^a	9,50^b
	p_p (SEM)	** (1,01)	*** (3,08)	*** (1,43)	*** (1,81)	nz (0,96)	*** (4,98)	nz (5,59)	*** (2,10)
oksidacija (%)	MAP	1,77 ^b	9,60 ^a	4,40 ^a	5,92 ^a	2,58 ^a	14,21 ^a	3,00 ^a	6,56 ^a
	VP	3,04 ^a	2,63 ^b	1,88 ^b	2,75 ^b	2,34 ^b	3,80 ^b	3,08 ^a	1,24 ^b
	p_p (SEM)	*** (0,00)	*** (0,00)	*** (0,00)	*** (0,00)	*** (0,00)	*** (0,00)	nz (0,60)	*** (0,00)
holesterol	MAP	726,6	797,7	811,1	745,6	736,7	828,8	778,1	834,4
	VP	807,8	759,4	798,5	730,6	781,3	790,6	770,4	755,5
	p_p (SEM)	nz (38,41)	nz (38,94)	nz (40,24)	nz (36,1)	nz (37,97)	nz (40,50)	nz (46,39)	nz (39,80)

MAP – pakiranje v modificirano atmosfero; VP – vakuumsko pakiranje; kontrola – nosilci (olja, škrob, sol) brez brinovega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_p , statistična verjetnost vpliva pakiranja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med načini pakiranja)

MAP – modified atmosphere packing; VP – vacuum packing; control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, nz – $p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_p , statistical probability of packing effect; means with a different superscript within columns (^{a,b}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of difference between MAP and VP packing)

Vakuumsko pakiranje pozitivno vpliva na manjšo vsebnost OH in stopnjo oksidacije (%) v običajnih in *n-3*-obogatenih mariniranih mini filejih glede na pakiranje v modificirano atmosfero. Ta vpliv je bil statistično značilen za vse vrste marinad, najbolj izrazit pa v primeru *n-3*-obogatenih mini filejev, ko smo kot nosilec ekstrakta uporabili sol, saj je vakuumsko pakiranje zmanjšalo količino skupnih OH kar za 6,2-krat glede na pakiranje v modificirano atmosfero.

Vakuumsko pakiranje se je pokazalo kot zelo učinkovito pri preprečevanju oksidacijskih procesov predvsem v primeru uporabe olja kot nosilca ekstrakta, saj smo poleg zmanjšanja števila TBK dosegli tudi zmanjšanje stopnje oksidacije in količine nastalih skupnih OH v primerjavi s pakiranjem v modificirano atmosfero. Količina skupnih OH se je pri

vakuumsko pakiranih običajnih mini filejih tako zmanjšala za 4,1-krat, pri *n*-3-obogatenih pa celo za 4,4-krat glede na pakirane v modificirano atmosfero.

Na osnovi vrednosti, ki opredeljujejo stopnjo oksidacije (število TBK, stopnja oksidacije holesterola, skupni OH) lahko sklepamo, da se je kot najbolj primeren nosilec pokazal škrob, kot najmanj pa olje.

4.3.4 Heterociklični aromatski amini

Poznani so številni dejavniki, ki pomembno vplivajo na količino nastalih HAA v mesu. Poleg vplivov, *n*-3-obogatitve, nosilca ekstrakta in vrste ekstrakta, ki smo jih kot dejavnike obravnavali v sklopu II, smo kompleksnost vplivov teh dejavnikov razširili še na vpliv časa skladiščenja in načina toplotne obdelave.

Preglednica 29: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3-obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C na vsebnost skupnih HAA (ng/kg) v mariniranih piščančjih mini filejih, toplotno obdelanih s tremi različnimi postopki (pečica IR, pečica, žar)

Table 29: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and storage time at temperature of (4 ± 1) °C in modified atmosphere on content of total heterocyclic amines (HAA) (ng kg⁻¹) of marinated chicken inner fillets, thermally treated by three different types (two-platted grill, oven and IR oven)

Način TO	IR			pečica			žar		
Dan/obogatitev	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)
kontrola									
1	356 ^{bA}	234 ^{bB}	*** (15)	258 ^{bB}	443 ^{aA}	*** (18)	696 ^{cB}	1315 ^{bA}	*** (53)
5	604 ^{aA}	286 ^{aB}	*** (45)	418 ^{aA}	323 ^{bB}	** (18)	1594 ^{bA}	1389 ^{bB}	* (75)
9	202 ^c	191 ^c	nz(73)	147 ^{cB}	476 ^{aA}	*** (17)	3968 ^{aA}	2782 ^{aB}	** (251)
<i>p_D</i> (SEM)	*** (70)	*** (9)		*** (14)	*** (21)		*** (168)	*** (139)	
olje									
1	1006 ^{bB}	1362 ^{aA}	** (60)	537 ^{bB}	630 ^{bA}	* (29)	1150 ^{bA}	975 ^{cB}	* (53)
5	1341 ^{aA}	224 ^{bB}	*** (22)	789 ^{aB}	1096 ^{aA}	*** (6)	2700 ^{aA}	2764 ^{bA}	nz(43)
9	265 ^{cA}	158 ^{bB}	* (48)	241 ^{cB}	280 ^{cA}	* (13)	2668 ^{aB}	3055 ^{aA}	*** (101)
<i>p_D</i> (SEM)	*** (0)	nz(1)		*** (1)	*** (1)		*** (2)	*** (2)	
škrob									
1	244 ^{bB}	321 ^{bA}	** (14)	305 ^{bA}	150 ^{bB}	*** (12)	1135 ^{cA}	973 ^{cB}	* (53)
5	425 ^{aB}	429 ^{aA}	* (1)	468 ^{aA}	282 ^{aB}	*** (6)	2687 ^{bA}	2011 ^{bB}	** (108)
9	178 ^{cA}	156 ^{cB}	* (8)	167 ^c	141 ^b	nz(12)	5032 ^{aA}	3491 ^{aB}	*** (136)
<i>p_D</i> (SEM)	*** (9)	*** (10)		*** (13)	*** (6)		*** (103)	*** (111)	
sol									
1	566 ^{bA}	344 ^{bB}	*** (23)	497 ^{bA}	364 ^{bB}	** (22)	1196 ^c	1177 ^c	nz(59)
5	867 ^{aA}	709 ^{aB}	*** (3)	675 ^a	691 ^a	nz(11)	3264 ^b	3114 ^a	nz(129)
9	175 ^{cB}	203 ^{cA}	* (9)	180 ^{cB}	377 ^{bA}	*** (15)	4516 ^{aA}	3064 ^{bB}	*** (124)
<i>p_D</i> (SEM)	*** (17)	*** (12)		*** (18)	*** (15)		*** (143)	*** (58)	

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez brinovega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, $nz - p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_E*, statistična verjetnost vpliva *n*-3-obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n*-3-obogatenimi mini fileji); *p_D*, statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, $nz - p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_E*, statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A,B}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between control and *n*-3-enriched inner fillets); *p_D*, statistical probability of storage time effect; means with a different superscript within columns (^{a,b,c}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between times of storage)

Analiza dobljenih rezultatov (preglednica 29; povzeta po prilogah C9-12) je pokazala, da se s časom skladiščenja količina HAA, v nasprotju z OH, peti dan najprej nekoliko poveča, z nadaljnjim skladiščenjem pa potem ponovno zmanjša, tako da so vrednosti deveti (zadnji) dan skladiščenja celo manjše od začetnih (prvi dan). To velja za vse skupine mariniranih mini filejev (vse marinade), ki so bili po devetdnevem skladiščenju toplotno obdelani v pečici IR in pečici. Pri pečenju na žaru pa je bil vpliv časa skladiščenja ravno nasproten, saj se je v primeru vseh marinad zadnji dan skladiščenja po toplotni obdelavi tvorilo največ HAA. Tu predvidevamo, da je ta pojav najverjetneje pretežno posledica vpliva načina toplotne obdelave in manj vpliva časa skladiščenja, kar je prikazano tudi v preglednici 30.

Podobno kot pri sekljancih v sklopu II se je tudi v tem primeru pokazal vpliv *n*-3-obogatitve na tvorbo HAA, ki pa je glede na vrsto marinade in način toplotne obdelave zelo različen. Negativen vpliv *n*-3-obogatitve se je pokazal v primeru uporabe olja pri pečenju v pečici in na žaru, ter soli kot nosilca pri pečenju v pečici in pečici IR, medtem ko se v primeru uporabe škroba kot nosilca ekstrakta pri *n*-3-obogatenih mini filejih tvori manj skupnih HAA kot pri običajnih mini filejih pri vseh postopkih toplotne obdelave.

Poleg vpliva *n*-3-obogatitve in časa skladiščenja smo v tem sklopu obravnavali tudi vpliv načina toplotne obdelave in vrste nosilca oz. dodatka ekstrakta brinovih jagod na količino skupnih HAA po določenem času skladiščenja.

Preglednica 30: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR) in nosilca (kontrola, olje, škrob in sol) ekstrakta brinovih jagod na vsebnost nekaterih posameznih in skupnih HAA (ng/kg) v obdelanih mini filejih piščancev, krmljenih z dodatkom mletega lanenega semena (*n*-3-obogatitev) in brez dodatka (običajno), po devetdnevem skladiščenju v modificirani atmosferi in pri temperaturi (4 ±1) °C

Table 30: Effects of type of thermal treatment (two-platted grill, oven and IR oven) and plant extract carrier (without, oil, starch and salt) on content of HAA (ng kg⁻¹) after thermal treatment of chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n*-3 enriched) and without (control), after 9 days of storing in modified atmosphere and at temperature of (4 ±1) °C

		Obogatitev običajen					<i>n</i> -3			
HAA	način TO	kontrola	olje	škrob	sol	nz(36)	kontrola	olje	škrob	sol
PhIP	IR	99 ^B	70 ^B	21 ^B	45 ^B	nz(36)	34 ^{BC}	40 ^{BB}	18 ^{CB}	68 ^{AC} ***(5)
	pečica	29 ^{dB}	83 ^{AB}	54 ^{BB}	42 ^{CB}	***(4)	285 ^{AB}	83 ^{CB}	39 ^{dB}	147 ^{BB} ***(8)
	žar	2829 ^{CA}	2036 ^{DA}	3913 ^{AA}	3518 ^{BA}	***(112)	2230 ^{BA}	2373 ^{BA}	2661 ^{AA}	1914 ^{CA} ***(14)
	<i>p</i> _{TO} (SEM)	***(41)	***(59)	***(49)	***(104)		***(91)	***(23)	***(64)	***(50)
skupni HAA	IR	202 ^B	265 ^B	178 ^B	175 ^B	nz(62)	191 ^{AC}	158 ^{BC}	156 ^{BB}	203 ^{AC} ***(9)
	pečica	147 ^{CB}	241 ^{AB}	167 ^{BB}	180 ^{BB}	***(11)	476 ^{AB}	280 ^{CB}	141 ^{DB}	377 ^{BB} ***(17)
	žar	3968 ^{CA}	2668 ^{DA}	5032 ^{AA}	4516 ^{BA}	***(185)	2782 ^{CA}	3055 ^{BA}	3491 ^{AA}	3064 ^{BA} ***(39)
	<i>p</i> _{TO} (SEM)	***(171)	***(86)	***(61)	***(102)		***(128)	***(30)	***(101)	***(134)

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez brinovega ekstrakta; značilnost vpliva: ****p* ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ***p* ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, **p* ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – *p* > 0,05 statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p*_N, statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod); *p*_{TO}, statistična verjetnost vpliva načina toplotne obdelave; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b, c}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med različnimi načini toplotne obdelave)

control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: ****p* ≤ 0.001 very highly statistically significant, ***p* ≤ 0.01 highly statistically significant, **p* ≤ 0.05 statistically significant, nz – *p* > 0.05 statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p*_N, statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D}) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of differences between different juniper berries extract carriers); *p*_{TO}, statistical probability of types of thermal treatment; means with a different superscript within columns (^{a, b, c}) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of differences between different types of thermal treatment)

Na osnovi rezultatov iz preglednice 30 (povzeta po prilogi C.15) lahko potrdimo, da je način toplotne obdelave eden ključnih dejavnikov, ki pomembno vpliva na tvorbo HAA. V skladu s pričakovanji se je podobno kot v sklopu II (predposkus) največ HAA tvorilo pri pečenju na žaru, kljub temu da je bila povprečna izguba mase pri tem načinu toplotne obdelave manjša kot pri pečenju v pečici in pečici IR (rezultati niso predstavljeni v preglednicah). Glavni razlog za večjo tvorbo HAA pri pečenju na žaru je neposreden kontakt površine mesa z razgreto ploščo žara, pri čemer pride do močnega koncentriranja prekursorjev HAA na površini. Bistveno manj HAA se je tvorilo pri pečenju v pečici in pečici IR. Pri tem se kos mesa namreč peče bistveno bolj enakomerno skozi celoten presek in tudi ni neposrednega kontakta površine mesa z grelnim telesom. Posledično ne pride do tako izrazite izgube vode (na površini) in koncentriranja prekursorjev na površini, kje je tvorba HAA najbolj izrazita (rezultati razvidni iz preglednice 30).

Nekoliko v nasprotju s pričakovanju se je pokazal vpliv nosilcev oz. dodatka samega ekstrakta brinovih jagod na tvorbo HAA, ki je bil pri obeh skupinah (običajen, *n*-3-obogaten) mini filejev obdelanih z vsemi tremi postopki toplotne obdelave statistično zelo visoko značilen ($p \leq 0,001$). Glede na predhodne znanstvene raziskave in rezultate dobljene v sklopu II smo pričakovali pozitiven vpliv dodatka ekstrakta brinovih jagod na zmanjšano tvorbo HAA zaradi njegovega antioksidativnega delovanja. Vendar, kot je razvidno iz preglednice 30, je bil učinek dodanega ekstrakta v nekaterih primerih ravno nasproten, pri čemer sta pomembno vlogo odigrala tudi način toplotne obdelave in *n*-3-obogatitev.

Pri pečenju v pečici in pečici IR je dodatek ekstrakta brinovih jagod vezanega na škrob praviloma nekoliko zmanjšal tvorbo HAA glede na kontrolno marinado (brez dodanega ekstrakta), še posebej izrazito v primeru *n*-3-obogatenih mini filejev (70 %, ni navedeno v preglednici). Podobno zmanjšanje smo dosegli tudi v primeru dodatka ekstrakta vezanega na sol, čeprav pri pečenju običajnih mini filejev v pečici pride do rahlega povečanja (22 %, ni navedeno v preglednici) glede na kontrolno marinado.

Izrazito nasproten učinek je škrob kot nosilec ekstrakta imel pri pečenju na žaru, saj je v tem primeru prišlo do največjega porasta količine skupnih HAA. Tako se je pri uporabi te marinade pri običajnih mini filejih količina skupnih HAA povečala za 27 %, pri *n*-3-obogatenih pa za 25 % glede na kontrolno marinado. Pri enakem postopku toplotne obdelave (žar) se je pokazal popolnoma nasproten učinek škroba oz. ekstrakta kot pri sekljancih iz sklopa II. To je verjetno posledica dejstva, da se v primeru mini filejev (cel kos mesa) škrob, ki lahko nastopa kot vir prekursorjev, nahaja pretežno na površini, ki prihaja v stik z grelno ploščo, medtem ko se pri sekljancih skupaj z ekstrakti vgradi v razdeto meso in v notranjosti ustvari »mrežo«, ki preprečuje prehajanje vode in prekursorjev na površino.

Zelo zanimiv je vpliv dodatka ekstrakta vezanega na olje, saj je njegov učinek pri običajnih mini filejih ravno nasproten kot pri *n*-3-obogatenih mini filejih. Pri pečenju običajnih mini filejev v pečici in pečici IR se je očitno pokazal negativen prooksidativen učinek dodanega ekstrakta vezanega na olje ali pa povečana količina HAA posledica dodane maščobe, katere vpliv na tvorbo HAA ni še popolnoma pojasnjen. Količina HAA se je glede na kontrolno marinado namreč v tem primeru povečala za 31 % pri pečenju v pečici IR oziroma za 64 % pri pečenju v pečici. Podobno je vezava ekstrakta na olje povzročila povečanje HAA glede

na kontrolno marinado tudi v primeru *n*-3–obogatenih mini filejev pečenih na žaru. To se je potem odražalo tudi v rahlo izraženi žarki aromi pri tovrstnih mini filejih, kjer smo kot nosilec uporabili olje (glej preglednico 31).

Popolnoma nasproten pa je bil učinek vezave ekstrakta na olje v primeru pečenja običajnih mini filejev na žaru ter *n*-3–obogatenih mini filejev pečenih v pečici in pečici IR, saj se je količina skupnih HAA v teh primerih glede na kontrolno marinado zmanjšala, kar pa nekako ne moremo razložiti kot antioksidativni učinek ekstrakta, ker se je tudi v tem primeru najbolj izrazila žarka aroma. V primeru pečenja na žaru lahko to deloma razložimo kot posledico boljšega prenosa toplote, ki ga omogoča olje, kar posledično pomeni krajši čas obdelave. V primeru *n*-3–obogatenih mini filejev pa že v splošnem velja, da se tvori značilno manj HAA v primerjavi z običajnimi mini fileji, kar lahko povežemo z večjo sposobnostjo vezanja vode v kombinaciji s prisotnim organskim selenom, ki ima ob tem še antioksidativni učinek.

4.3.5 Vrednotenje senzoričnih lastnosti

Pri uporabi raznih dodatkov moramo biti zelo previdni, saj moramo poleg njihovih pozitivnih učinkov upoštevati tudi dejstvo, da lahko precej negativno vplivajo na senzorične lastnosti samega živila in ga lahko naredijo celo senzorično nesprejemljivega. Prav iz tega razloga smo v okviru analiz opravljenih v sklopu III izvedli tudi vrednotenje senzoričnih lastnosti toplotno obdelanih mini filejev, da bi preverili morebitne negativne vplive ekstrakta brinovih jagod. Preskuševalci so se pri ocenjevanju osredotočili predvsem na pojav žarkosti in WOF arome ter ostalih tujih arom in vonjev.

Pojav izrazito tuje in neznačilne arome, ki so jo preskuševalci opisovali kot aromo »po rožah«, po brinu oz. kot grenko aromo, in je povezana z dodatkom ekstrakta brinovih jagod, je bilo najmočneje zaznati v primeru vezave ekstrakta na olje. To potrjuje tudi preglednica 31 (povzeta po prilogi C.18), ki nazorno prikazuje izrazito značilen vpliv ($p \leq 0,001$) vrste nosilca ekstrakta na pojav tuje arome neodvisno od načina toplotne obdelave in *n*-3–obogatitve (glej prilogo C.17). Pri tem se je pokazalo, da se s časom skladiščenja intenziteta te tuje arome, predvsem pri olju, nekoliko zmanjša (priloga C.17). Zelo podoben je bil negativen učinek olja kot nosilca ekstrakta tudi v primeru pojava tujih vonjev, čeprav ta vpliv ni bil tako izrazit.

Poleg tuje arome in vonja smo določali tudi pojav žarkosti in WOF arome, ki je oblika oksidativne žarkosti v toplotno obdelanem mesu, in se razvije v že nekaj urah ali dneh v nasprotju z običajno žarkostjo, ki se razvije med večmesečnim skladiščenjem ali zamrzovanjem surovega mesa ali maščobe. Glede na to, da je bil čas skladiščenja dokaj kratek, žarke arome praktično ni bilo možno zaznati v nobenem primeru, kljub temu da smo s predhodnimi kemijskimi analizami pokazali, da oksidacijski procesi že potekajo (povečan TBK, tvorba OH). Manjša odstopanja so se pojavila le v primeru uporabe olja kot nosilca. Dejstvo je, da so lipidni hidroperoksidi kot glavni primarni produkti oksidacije lipidov nehlapni, brez vonja in okusa in kot taki ne vplivajo na poslabšanje kakovosti živil. V fazi sekundarne oksidacije pa se nato razgradijo do številnih stabilnih sekundarnih produktov, to so hlapne (aldehidi, ketoni), alkoholi, ogljikovodiki (alkani, alkeni) in furani, ki povzročajo poslabšanje arome in nadaljnje reakcije, ki vodijo do poslabšanja kakovosti.

Preglednica 31: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR) in nosilca (kontrola, olje, škrob in sol) ekstrakta brinovih jagod na senzorične lastnosti toplotno obdelanih mariniranih običajnih in *n-3*-obogatenih mini filejev, pakiranih v modificirani atmosferi, med devetdnevnim skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C

Table 31: Effects of type of thermal treatment (two-platted grill, oven and IR oven) and juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on sensory properties after thermal treatment of marinated chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n-3* enriched) and without (control), during 9 days at (4 ±1) °C in modified atmosphere

Dan	Parameter	TO/nosilec	Obogatitev običajen				$p_N(\text{SEM})$	<i>n-3</i>				$p_N(\text{SEM})$
			kontrola	olje	škrob	sol		kontrola	olje	škrob	sol	
9	tuji vonji	IR	1,0 ^B	1,5 ^{bA}	1,3 ^{AB}	1,3 ^{AB}	*(0,2)	1,3 ^{AB}	1,5 ^A	1,3 ^{AB}	1,0 ^{bB}	*(0,2)
		pečica	1,0 ^C	1,5 ^{bA}	1,5 ^A	1,3 ^B	** (0,1)	1,5	1,5	1,5	1,5 ^a	nz(0,3)
	žar	1,0 ^B	2,0 ^{aA}	1,3 ^B	1,3 ^B	*** (0,2)	1,3 ^{AB}	1,5 ^A	1,3 ^{AB}	1,0 ^{bB}	*(0,1)	
	$p_{TO}(\text{SEM})$	-(0)	*** (0)	nz(0,2)	nz(0,3)		nz(0,4)	-(0)	nz(0,2)	*** (0)		
žarkost	IR	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,3 ^b	1,0 ^b	1,0	1,0	nz(0,1)	
	pečica	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,8 ^{aB}	2,0 ^{aA}	1,0 ^C	1,0 ^C	*** (0,1)	
	žar	1,0	1,3	1,0	1,0	nz(0,2)	1,0 ^b	1,0 ^b	1,0	1,0	-(0)	
	$p_{TO}(\text{SEM})$	-(0)	nz(0,1)	-(0)	-(0)		*(0,2)	*** (0)	-(0)	-(0)		
WOF	IR	1,8 ^b	1,5 ^b	1,5 ^b	1,5 ^b	nz(0,2)	1,8 ^{bA}	1,3 ^{bBC}	1,5 ^{aAB}	1,0 ^{bC}	** (0,2)	
	pečica	2,5 ^{aA}	2,0 ^{aB}	2,0 ^{aB}	2,5 ^{aA}	*** (0)	2,5 ^{aA}	1,5 ^{bB}	1,5 ^{aB}	2,0 ^{aAB}	*(0,4)	
	žar	1,0 ^c	1,3 ^b	1,0 ^c	1,0 ^c	nz(0,1)	1,0 ^{cB}	2,5 ^{aA}	1,0 ^{bB}	1,0 ^{bB}	*** (0)	
	$p_{TO}(\text{SEM})$	*** (0,1)	** (0,1)	*** (0)	*** (0)		*** (0,1)	*** (0,3)	*** (0)	** (0,3)		
tuje arome	IR	1,0 ^{bD}	3,5 ^{aA}	2,0 ^B	1,5 ^C	*** (0)	1,3 ^{abC}	3,0 ^A	1,8 ^B	1,0 ^{bC}	*** (0,2)	
	pečica	1,5 ^{aD}	3,0 ^{bA}	2,0 ^B	1,8 ^C	*** (0,1)	1,5 ^{aB}	3,3 ^A	1,5 ^B	1,5 ^{aB}	*** (0,1)	
	žar	1,0 ^{bD}	3,3 ^{abA}	2,0 ^B	1,5 ^C	*** (0,2)	1,0 ^{bC}	3,0 ^A	1,5 ^B	1,5 ^{aB}	*** (0)	
	$p_{TO}(\text{SEM})$	*** (0)	*(0,1)	-(0)	nz(0,1)		*(0,1)	nz(0,1)	nz(0,1)	*** (0)		

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_N , statistična verjetnost vpliva nosilca rastlinskega ekstrakta; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod); p_{TO} , statistična verjetnost vpliva načina toplotne obdelave; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b, c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med načini toplotne obdelave)

control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_N , statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different plant extract carriers); p_{TO} , statistical probability of type of thermal treatment effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (^{a, b, c}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences

Značilna nezaželeno sprememba povezana z oksidacijo lipidov, ki se pojavi predvsem pri toplotno obdelanem mesu, je tudi t.i. aroma po postanem, pogretem (WOF). WOF senzorično zaznamo kot tujo, neprijetno aromo po lepenki ali oljnati barvi, ki prikriva zaželeno svežo aromo toplotno obdelanega mesa. Podobno kot žarka aroma tudi WOF aroma v nobenem primeru ni bila zelo močno izražena. Kot je razvidno iz priloge C.17 se jakost WOF arome praviloma s časom skladiščenja nekoliko poveča. Najbolj izrazito poslabšanje je bilo v primeru kontrolne marinade brez dodanega ekstrakta, kar kaže na njegov pozitiven učinek. Iz preglednice 31 lahko pri obeh skupinah mini filejev (običajen in *n-3*-obogaten) razberemo, da način toplotne obdelave pomembno vpliva ($p \leq 0,001$ in $p \leq 0,01$) na pojav WOF arome, saj je bila pri vseh marinadah najbolj izražena pri pečenju v pečici, najmanj pa pri pečenju na žaru. To je povezano predvsem s časom in temperaturo toplotne obdelave, saj višja temperatura in krajši čas, kar dosežemo pri pečenju na žaru, upočasnita oksidacijske procese, saj se pri tem zniža aktivacijska energija za oksidacijo in tako je ovirana pretvorba hidroperoksida v proste radikale, ki stimulirajo oksidacijske procese (Bastida in sod., 2009).

4.4 SKLOP IV: RAZLIČNI AEROBNI POGOJI V EMBALAŽNI ENOTI IN NJIHOV VPLIV NA TVORBO PRODUKTOV OKSIDACIJE IN HAA V KOMERCIALNIH PIŠČANČJIH SEKLJANCIH, OBOGATENIH Z *n*-3 VNMK

4.4.1 Osnovna kemijska sestava sekljancev

Preglednica 32: Osnovni statistični parametri osnovne kemijske sestave običajnih in *n*-3–obogatenih piščančjih sekljancev

Table 32: Basic statistical parameters for the chemical composition of control and *n*-3 enriched chicken patties

Sekljanec	Statistični parameter	Parameter (g/100 g)		
		voda	beljakovine	maščobe
<i>n</i> -3	povprečje	69,24	19,30	8,16
	najmanjša vrednost	68,86	18,73	7,52
	največja vrednost	69,74	20,35	9,32
	standardni odklon	0,33	0,61	0,81
	koeficient variabilnosti (%)	0,5	3,2	9,9
običajen	povprečje	69,65	19,41	7,47
	najmanjša vrednost	69,08	18,37	7,09
	največja vrednost	70,68	20,25	7,77
	standardni odklon	0,62	0,79	0,30
	koeficient variabilnosti (%)	0,9	4,1	4,0

Osnovno kemijsko sestavo običajnih in *n*-3–obogatenih piščančjih sekljancev smo analizirali po osemdnevnem skladiščenju, vendar pred toplotno obdelavo, in sicer na vzorcih z oznako MAP–hCO₂. Rezultati te analize so nam pokazali relativno dobro homogenost vzorcev. Pomembna komponenta sekljancev je bila v našem poskusu maščoba, saj je ta lahko eden izmed ključnih vzrokov za poslabšanje senzoričnih lastnosti, predvsem zaradi podvrženosti oksidacijskim procesom. Povprečna vsebnost maščobe v običajnih sekljancih je bila 7,47 g/100 g, medtem ko je bilo maščobe v sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 VNMK nekoliko več – 8,16 g/100 g. Pri tem so koeficienti variabilnosti glede deleža maščob relativno visoki (9,9 %), saj je težko zagotoviti bolj enako vsebnost maščob v treh proizvodnih ponovitvah oz. serijah. Najbolj konstantni sta vsebnosti vode in beljakovin v sekljancih; v običajnih je v 100 g 69,65 g vode in 19,41 g beljakovin, v sekljancih *n*-3 pa 69,24 g vode in 19,30 g beljakovin.

4.4.1.1 Maščobnokislinska sestava

V običajnih in *n*-3–obogatenih sekljancih smo po osemdnevnem skladiščenju skupno določili 25 različnih MK. Najbolj zastopana MK je oleinska kislina, delež katerega je bil med 36,8 % in 37,6 %, kot je prikazano v preglednici 33. Opazili smo značilen vpliv povečane vsebnosti *n*-3 VNMK v krmi piščancev na maščobnokislinsko sestavo končnega izdelka (sekljancev). Pri običajnih in *n*-3–obogatenih sekljancih največji delež maščobnih kislin predstavljajo ENMK (predvsem oleinska kislina) – 43,7 % vs. 42,8 %. Kar je še pomembneje je, da je pri *n*-3-obogatenih sekljancih za 6,3 % več VNMK kot pri običajnih (23,6 % vs. 22,2 %). Delež NMK (predvsem stearinske kisline) je značilno večji pri običajnih sekljancih v primerjavi z *n*-3–obogatenimi sekljanci.

Preglednica 33: Maščobne kisline in njihova vsebnost (g/100 g SMK) v običajnih in *n*-3-obogatenih piščančjih sekljancih

Table 33: Fatty-acids and their contents (g/100 g TFA) in the control and *n*-3-enriched chicken patties

Maščobna kislina/obogatitev	običajen	<i>n</i> -3	p_E (SEM)
6:0	0,30	0,28	nz (0,03)
8:0	0,15	0,18	nz (0,07)
10:0	0,01	0,01	nz (<0,01)
12:0	0,12	0,12	nz (<0,01)
14:0	0,71	0,69	nz (0,01)
14:1 <i>cis</i> -9	0,15	0,15	nz (<0,01)
15:0	0,11 ^a	0,10 ^b	* (<0,01)
15:1 <i>cis</i> -5	0,26	0,26	nz (0,01)
16:0 (palmitinska)	21,4 ^a	21,0 ^b	* (0,12)
16:1 <i>trans</i> -9	0,43	0,41	nz (0,01)
16:1 <i>cis</i> -9	4,46	4,51	nz (0,04)
17:0	0,17 ^a	0,15 ^b	** (<0,01)
17:1 <i>trans</i> -9	0,13	0,13	nz (<0,01)
17:1 <i>cis</i> -9	0,07	0,06	nz (<0,01)
18:0 (stearinska)	6,53 ^a	6,20 ^b	*** (0,02)
18:1 <i>trans</i> -9	0,27 ^a	0,17 ^b	** (0,02)
18:1 <i>cis</i> -9 (oleinska)	37,6 ^a	36,8 ^b	* (0,22)
18:2 <i>cis</i> -9,12 (linolna)	19,0	18,3	nz (0,24)
18:3 <i>cis</i> -6,9,12	0,10	0,06	nz (0,02)
18:3 <i>cis</i> -9,12,15 (ALA)	1,80 ^b	3,98 ^a	*** (0,11)
20:1 <i>cis</i> -11	0,36 ^a	0,32 ^b	*** (<0,01)
20:4&20:3	0,85 ^a	0,73 ^b	*** (0,01)
20:5 <i>cis</i> -5,8,11,14,17 (EPA)	<0,01	<0,01	- (0,01)
22:5 <i>cis</i> -4,7,10,13,16	0,20 ^a	0,12 ^b	*** (0,01)
22:5 <i>cis</i> -7,10,13,16,19 (DPA)	0,15 ^b	0,24 ^a	*** (0,01)
22:6 <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19 (DHA)	0,12 ^b	0,14 ^a	*** (<0,01)
NMK	29,5 ^a	28,7 ^b	*** (0,13)
ENMK	43,7 ^a	42,8 ^b	nz (0,27)
VNMK	22,2 ^b	23,6 ^a	** (0,35)
<i>trans</i> MK	0,83 ^a	0,71 ^b	** (0,03)
<i>n</i> -6 MK	20,1 ^a	19,2 ^b	* (0,24)
<i>n</i> -3 MK	2,07 ^b	4,36 ^a	*** (0,12)
razmerje <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	10,1 ^a	4,43 ^b	*** (0,41)
razmerje večkrat nenasičene/nasičene	0,75 ^b	0,82 ^a	*** (0,01)

SMK, skupne maščobne kisline; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz - $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; p_E - statistična verjetnost vpliva obogatitve prehrane z *n*-3 VNMK; SEM, standardna napaka povprečja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n*-3-obogatenimi piščančjimi sekljanci); *n*-6: 18:2*cis*-9,12 + 18:3*cis*-6,9,12 + 20:4 & 20:3 + 22:5*cis*-4,7,10,13,16; *n*-3: 18:3*cis*-9,12,15 + 22:5*cis*-7,10,13,16,19 + 22:6*cis*-4,7,10,13,16,19; razmerje *n*-6/*n*-3: (18:2*cis*-9,12 + 18:3*cis*-6,9,12 + 20:4 & 20:3 + 22:5*cis*-4,7,10,13,16) / (18:3*cis*-9,12,15 + 22:5*cis*-7,10,13,16,19 + 22:6*cis*-4,7,10,13,16,19); razmerje večkrat nenasičene/nasičene: (18:2*cis*-9,12 + 18:3*cis*-6,9,12 + 20:4 & 20:3 + 22:5*cis*-4,7,10,13,16 + 18:3*cis*-9,12,15 + 22:5*cis*-7,10,13,16,19 + 22:6*cis*-4,7,10,13,16,19) / (6:0 + 8:0 + 10:0 + 12:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0)

TFA, total fatty acids; levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz - $p > 0,05$ statistically not significant; p_E - statistical probability of *n*-3 enrichment effect; SEM, standard error of mean; means with a different superscript within rows (^{a,b}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between control and *n*-3-enriched chicken patties); *n*-6: 18:2*cis*-9,12 + 18:3*cis*-6,9,12 + 20:4 & 20:3 + 22:5*cis*-4,7,10,13,16; *n*-3: 18:3*cis*-9,12,15 + 22:5*cis*-7,10,13,16,19 + 22:6*cis*-4,7,10,13,16,19; *n*-6/*n*-3 ratio: (18:2*cis*-9,12 + 18:3*cis*-6,9,12 + 20:4 & 20:3 + 22:5*cis*-4,7,10,13,16) / (18:3*cis*-9,12,15 + 22:5*cis*-7,10,13,16,19 + 22:6*cis*-4,7,10,13,16,19); polyunsaturated/ saturated ratio: (18:2*cis*-9,12 + 18:3*cis*-6,9,12 + 20:4 & 20:3 + 22:5*cis*-4,7,10,13,16 + 18:3*cis*-9,12,15 + 22:5*cis*-7,10,13,16,19 + 22:6*cis*-4,7,10,13,16,19) / (6:0 + 8:0 + 10:0 + 12:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0)

Statistično zelo visok vpliv prehrane živali lahko opazimo pri vsebnosti skupnih *n*-3 VNMK in predvsem α -linolenske kisline (ALA, C18:*cis*-9,12,15), ki je predstavlja največji delež VNMK, 91 %, ostalih 9 % pa predstavljata dokozapentoenojska (DPA, 22:5*n*-3) in dokozahexaenojska (DHA, 22:6*n*-3), delež eikozapentaenojske kisline (EPA, 20:5*n*-3) pa je bil pod mejo detekcije. V običajnih sekljancih znaša vsebnost ALA 1,8 %, v *n*-3-obogatenih pa kar 3,98 %. Prav zaradi povečanja deleža ALA v *n*-3-obogatenih sekljancih se izboljša tudi razmerje *n*-6/*n*-3, ki znaša 4,4:1, medtem ko je pri običajnih sekljancih to razmerje bistveno večje, 10:1 (preglednica 33).

4.4.2 Koncentracija plinov v embalažnih enotah

Preglednica 34: Sestava plinske mešanice (%) v embalažnih enotah piščančjih sekljancev na dan pakiranja in po osemdnevem skladiščenju pri temperaturi (4 ± 1) °C

Table 34: Gas compositions in the packages of chicken patties on packaging day and after 8 days of storage at (4 ± 1) °C

Plin	Dan	Sestava plinske mešanice v atmosferi embalažnih enot (%)				p_p (SEM)
		MAP-hCO ₂	WF-ICO ₂	MAP-hO ₂	MAP-IO ₂	
O ₂	0	20,4 ^{Ca}	21,2 ^{Ba}	76,9 ^{Ab}	0,7 ^D	*** (0,1)
	8	18,8 ^{Bb}	19,4 ^{Bb}	79,7 ^{Aa}	0,5 ^C	*** (0,3)
	p_s (SEM)	*** (0,3)	*** (0,1)	*** (0,5)	nz (0,1)	
CO ₂	0	30,3 ^{Aa}	0,8 ^{Db}	22,0 ^{Ca}	23,5 ^{Ba}	*** (0,2)
	8	17,9 ^{Ab}	2,3 ^{Da}	14,0 ^{Bb}	13,8 ^{Bb}	*** (0,2)
	p_s (SEM)	*** (0,3)	*** (0,0)	*** (0,1)	*** (0,1)	

MAP-hCO₂, veliko CO₂; WF-ICO₂, zavijanje v folijo, prepustno za zrak; MAP-hO₂, veliko O₂; MAP-IO₂, malo O₂; značilnost vpliva:

*** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, $nz - p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_p , statistična verjetnost vpliva sestave plinske mešanice; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sestavami plinske mešanice v embalažnih enotah); p_s , statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

MAP-hCO₂, high CO₂; WF-ICO₂, wrapping, air permeable; MAP-hO₂, high O₂; MAP-IO₂, low O₂; levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, $nz - p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_p , statistical probability of package-atmosphere condition effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between different package-atmosphere compositions); p_s , statistical probability of storage effect; means with a different superscript within columns (^{a, b}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences during storage)

Po osemdnevem skladiščenju se koncentraciji O₂ in CO₂ v embalažnih enotah glede na sestavo plinov ob polnjenju značilno spremenita ($p < 0,001$) v vseh eksperimentalnih skupinah, razen koncentracije O₂ embalažnih enotah z malo O₂ (preglednica 34, MAP-IO₂), kjer vpliv ni značilen. To je posledica absorpcije plinov v tkivo (meso), proizvodnje plinov med mišično respiracijo, nekaj plina pa lahko nastane tudi kot posledica delovanja prisotne bakterijske flore v mesu (Keokamnerd in sod., 2008). Koncentracije O₂ in CO₂ se med skladiščenjem embalažnih enot na splošno močno zmanjšajo, izjema je le embalažna enota z veliko O₂, t.j. MAP-hO₂, kjer se koncentracija O₂ značilno poveča iz 76,9 % na 79,7 % in enota WF-ICO₂, kjer se značilno poveča koncentracija CO₂ iz 0,8 % na 2,3 %. Medtem pa je zmanjšanje koncentracije CO₂ po osemdnevem skladiščenju neodvisno od koncentracije CO₂ ob pakiranju: v enotah z veliko CO₂ (MAP-hCO₂) 41 %, v enotah z veliko O₂ (MAP-hO₂) 36 % in v enotah z malo O₂ (MAP-IO₂) 41 %. Gill (1988) ugotavlja, da je CO₂ močno topen v vodi in oljih, zato se z lahkoto absorbira v mišice in maščobe med skladiščenjem.

Čeprav koncentracije N_2 v embalažnih enotah v tej študiji nismo merili, se njegova koncentracija med skladiščenjem v embalažnih enotah praviloma povečuje (Daun in sod., 1971), kar še posebej velja za meso, pakirano v atmosfere bogate z O_2 .

4.4.3 Instrumentalno merjenje barve površine sekljancev

Po osem dnevnem skladiščenju smo na presnih običajnih in n -3-obogatenih sekljancih izvedli instrumentalno merjenje barve površine in v preglednici 35 so predstavljeni rezultati vpliva n -3-obogatitve in sestave atmosfere v embalažnih enotah na vrednosti L^* , a^* , b^* .

Preglednica 35: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (n -3-obogatitev) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osem dnevnim skladiščenjem pri temperaturi (4 ± 1) °C na instrumentalno izmerjeno barvo površine presnih sekljancev

Table 35: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (n -3 enriched) and different package-atmosphere conditions during 8 days of storing at (4 ± 1) °C on instrumental colour values raw chicken patties

Parameter	Obogatitev	Atmosfera v embalažnih enotah				p_p (SEM)
		MAP-hCO ₂	WF-ICO ₂	MAP-hO ₂	MAP-IO ₂	
L^*	običajen	49,60 ^{Bb}	50,01 ^{ABb}	50,70 ^{Ab}	49,30 ^{Bb}	* (2,46)
	n -3	51,51 ^{Ba}	52,44 ^{Aa}	52,87 ^{Aa}	52,60 ^{Aa}	* (2,41)
	p_E (SEM)	*** (2,28)	*** (2,49)	*** (2,09)	*** (2,83)	
a^*	običajen	14,29 ^{BC}	15,82 ^A	14,59 ^B	13,69 ^C	*** (1,98)
	n -3	14,48 ^B	15,99 ^A	14,94 ^B	13,24 ^C	*** (1,71)
	p_E (SEM)	nz (2,00)	nz (1,97)	nz (1,87)	nz (1,54)	
b^*	običajen	15,32 ^B	16,23 ^A	15,25 ^{Bb}	13,92 ^C	*** (1,17)
	n -3	15,44 ^B	16,57 ^A	15,67 ^{Ba}	13,98 ^C	*** (1,19)
	p_E (SEM)	nz (0,90)	nz (1,24)	* (1,01)	nz (1,49)	

MAP-hCO₂, veliko CO₂; WF-ICO₂, zavijanje v folijo, prepustno za zrak; MAP-hO₂, veliko O₂; MAP-IO₂, malo O₂; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_p , statistična verjetnost vpliva atmosfere v embalažni enoti; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D, E}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi atmosferami v embalažni enoti); p_E , statistična verjetnost vpliva n -3-obogatenja krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in n -3-obogatenimi sekljanci)

MAP-hCO₂, high CO₂; WF-ICO₂, wrapping, air permeable; MAP-hO₂, high O₂; MAP-IO₂, low O₂; levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz – $p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_p , statistical probability of package-atmosphere composition effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D, E}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between different package-atmosphere conditions); p_E , statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (^{a, b}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between control and n -3-enriched patties).

Atmosfera v embalažni enoti statistično značilno vpliva na vrednost L^* ($p < 0,05$) ter vrednosti a^* in b^* ($p < 0,001$), izmerjene po osem dnevnem skladiščenju na površini presnih sekljancev (preglednica 35). Ugotovili smo, da so vrednosti a^* in b^* običajnih in n -3-obogatenih sekljancev, pakiranih v prepustno folijo (WF-ICO₂), statistično značilno večje od ostalih pakiranj, predvsem od MAP-IO₂, manj od MAP-hCO₂ in MAP-hO₂. Srednje vrednosti parametrov a^* in b^* sekljancev, pakiranih v MAP-hCO₂, se razlikujejo od sekljancev, pakiranih v MAP-hO₂, vendar razlika ni statistično značilna.

Pri tem velja, da n -3-obogatitev značilno ($p < 0,001$) vpliva le na vrednost L^* , saj so bile večje vrednosti L^* izmerjene na n -3-obogatenih sekljancih, ne glede na način pakiranja. Nasprotno n -3-obogatitev ne vpliva značilno na izmerjeni vrednosti a^* in b^* ($p > 0,05$), kar je tudi razvidno iz preglednice 35.

4.4.4 Število tiobarbiturne kisline (TBK)

Določanje števila TBK oziroma vsebnosti malondialdehida je ena izmed enostavnejših metod za ugotavljanje stopnje oksidacije maščobe oz. mesa, ki vsebuje maščobe. Iz preglednice 36 je razvidno, da spreminjanje atmosfere v embalažnih enotah običajnih in *n*-3–obogatenih sekljancev značilno ($p < 0,001$) vpliva na stopnjo oksidacije oz. število TBK. Razvidna je tudi značilna razlika ($p < 0,001$) med običajnimi in *n*-3–obogatenimi sekljanci ne glede na način pakiranja. *n*-3–obogatitev piščančjega mesa močno prizadene oksidativno stabilnost sekljancev po toplotni pripravi, saj smo največja števila TBK določili v *n*-3–obogatenih sekljancih, ki so povprečno za 68 % večja kot pri običajnih sekljancih, ne glede na sestavo atmosfere v embalažni enoti (podatki niso razvidni iz preglednic).

Preglednica 36: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3–obogatitev) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osemdnevnim skladiščenjem pri temperaturi (4 ± 1) °C na oksidacijo lipidov (TBK, mg malondialdehida/kg) na presnih sekljancih

Table 36: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and different package-atmosphere conditions during 8 days of storing at (4 ± 1) °C on lipid oxidation (TBARS, mg malondialdehyde kg^{-1}) of raw chicken patties

Parameter	Obogatitev	Atmosfera v embalažnih enotah				p_P (SEM)
		MAP–hCO ₂	WF–lCO ₂	MAP–hO ₂	MAP–lO ₂	
TBK	običajen	0,17 ^{Bb}	0,18 ^{Bb}	0,38 ^{Ab}	0,13 ^{Cb}	*** (0,11)
	<i>n</i> -3	0,20 ^{Ba}	0,25 ^{Ba}	0,69 ^{Aa}	0,14 ^{Ba}	*** (0,29)
	p_E (SEM)	*(0,02)	*** (0,05)	*** (0,43)	*** (0,02)	

Legenda: glej preglednico 35; legend: see table 35

Očitne razlike v številu TBK so tudi pri različnih načinih pakiranja oz. različni sestavi atmosfere v embalažnih enotah. Največje povečanje stopnje oksidacije lipidov med osemdnevnim skladiščenjem v hladilniku smo ugotovili pri sekljancih obeh skupin (običajnih in *n*-3–obogatenih) pakiranih v embalažne enote z veliko O₂ (MAP–hO₂). Pri tej sestavi atmosfere se je pri *n*-3–obogatenih sekljancih število TBK bistveno bolj povečalo kot pri običajnih. Manj kot je v embalažnih enotah O₂, manjše je število TBK v sekljancih (preglednica 36). Število TBK je torej značilno najmanjše pri sekljancih pakiranih v embalažne enote z najmanjšo koncentracijo O₂ (MAP–lO₂, manj kot 0,5 % O₂), nekoliko večje pa v embalažnih enotah zavrtih v prepustno folijo (WF–lCO₂) ali z atmosfero 20 % O₂ in 30 % CO₂ (MAP–hCO₂).

4.4.5 Holesterol in oksidi holesterola

Dostopnih je več študij, ki so se fokusirale na vpliv različnih toplotnih postopkov na tvorbo različnih OH, v njih navajajo bolj ali manj opazno povečanje njihove vsebnosti po toplotni obdelavi (Conchillo in sod., 2003; Bonoli in sod., 2007; Vicente in Torres, 2007). Prav tako smo v študijah zasledili, da presno meso oz. izdelki lahko vsebujejo OH (Rodriguez-Estrada in sod., 1997) in da toplotna obdelava lahko poveča vsebnost OH, tako je bil cilj naše študije proučiti vpliv toplotne obdelave piščančjih sekljancev po osemdnevnem skladiščenju pod različnimi atmosferami v embalažnih enotah.

Povprečno so pečeni sekljanci v naši študiji vsebovali 558,12 ($\pm 33,26$) mg holesterola/kg (podatki niso razvidni iz preglednic). Meritve LC-MS/MS kažejo značilen ($p < 0,001$) vpliv

različne sestave atmosfere na vsebnost holesterola (preglednica 37). Na drugi strani pa *n*-3-obogatitev ne vpliva značilno ($p > 0,05$) na vsebnost holesterola, saj smo podobno vsebnost določili pri običajnih in *n*-3-obogatenih sekljancih. Rezultati so nekoliko presenetljivi, ker smo v *n*-3-obogateni skupini pričakovali manjšo vsebnost holesterola zaradi predvidene obsežnejše oksidacije holesterola v sekljancih z manjšo oksidacijsko stabilnostjo. Holesterola v toplotno obdelanih sekljancih, predhodno pakiranih v različne atmosfere, je bilo v atmosferi z malo O₂ od 578,15 mg/kg (MAP-IO₂), v atmosferi z veliko O₂ od 565,18 mg/kg do 571,84 mg/kg (MAP-hCO₂, WF-ICO₂) in v atmosferi, bogati z O₂, 495,64 mg/kg (MAP-hO₂), ne glede na *n*-3-obogatitev. Vsebnost holesterola pa je bila tudi v negativni korelaciji z vsebnostjo OH ($r = -0,98$, $p = 0,0001$, podatek ni v preglednicah).

V poskusu smo z LC-MS/MS identificirali več OH, in sicer 7 α -hidroksiholesterol (7 α -HC), 7 β -hidroksiholesterol (7 β -HC), 20 α -hidroksiholesterol (20 α -HC), 22-hidroksiholesterol (22-HC) in 25-hidroksiholesterol (25-HC) (povzeto po prilogi D.1). Skupna vsebnost OH v našem poskusu je v območju med 0,38 mg/kg in 128,70 mg/kg, povprečje pa je 24,33 mg/kg pečenih sekljancev (podatki niso predstavljeni v preglednicah). Preglednica 37 prikazuje značilna vpliva dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev ($p < 0,01$) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osemdnevnim skladiščenjem pri temperaturi (4 ± 1) °C ($p < 0,001$) na vsebnost OH.

Skupnih oksidov holesterola smo v embalažnih enotah, po osemdnevnem skladiščenju, z zelo malo kisika O₂ (MAP-IO₂) določili med 1,08 mg/kg in 4,56 mg/kg v atmosferi podobni zraku (MAP-hCO₂ in WF-ICO₂) med 5,91 mg/kg in 20,69 mg/kg ter v atmosferi bogati s O₂ (MAP-hO₂) med 97,31 mg/kg in 101,02 mg/kg (glej preglednico 37).

Pri tem lahko opazimo značilne razlike v količini nastalih OH in stopnjo oksidacije v sekljancih glede na sestavo atmosfere v embalažni enoti. Po osemdnevnem skladiščenju se v običajnih sekljancih pakiranih v embalažne enote z malo O₂ (MAP-IO₂) tvori približno 6-krat oz. 12-krat manj OH kot pri sekljancih, pakiranih v atmosfero z nekoliko več O₂ (MAP-hCO₂ in WF-ICO₂). Še bolj izrazita je ta razlika, če to pakiranje z majhno koncentracijo O₂ (MAP-IO₂) primerjamo s pakiranjem z veliko O₂ (MAP-hO₂), saj se pri sekljancih pakiranih v atmosferi MAP-IO₂ tvori približno 90-krat manj OH v primerjavi s tistimi pakiranimi v atmosferi MAP-hO₂. S tem se je potrdil prooksidativni vpliv atmosfer bogatih z O₂. Podobno velja za *n*-3-obogatene sekljance, vendar v manjšem obsegu, tako npr. atmosfera bogata z O₂ (WF-ICO₂ in MAP-hO₂) v primerjavi z atmosfero z malo O₂ (MAP-IO₂) poveča količino nastalih OH za 5-krat oz. 22-krat. Pri tem se seveda posledično poveča tudi obseg oksidacije, in sicer za 4-krat oz. 21-krat glede na atmosfero z majhno koncentracijo O₂ (MAP-IO₂).

Poudariti moramo, da smo ugotovili tudi značilne razlike v vsebnosti OH med običajnimi in *n*-3-obogatenimi sekljanci. Povprečne vsebnosti za posamezne in skupne OH so namreč v *n*-3-obogatenih sekljancih pri vseh načinih pakiranja oz. različnih atmosferah, razen pri pakiranju z veliko O₂ (MAP-hO₂), statistično značilno večje ($p < 0,01$ in $p < 0,001$) kot pri običajnih sekljancih. Tudi v primeru pakiranja MAP-hO₂ se več OH tvori v *n*-3-obogatenih sekljancih v primerjavi z običajnimi, vendar ta razlika statistično ni značilna ($p > 0,05$) zaradi velikega standardnega odklona.

Preglednica 37: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3–obogatitev) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osemdnevnim skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C na vsebnost holesterola in skupnih oksidov holesterola (OH, mg/kg) ter stopnje oksidacije (%) po pečenju na dvoploščnem žaru

Table 37: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and different package-atmosphere conditions during 8 days of storing at (4 ±1) °C on content of cholesterol and cholesterol oxides (OH, mg kg⁻¹) as well as oxidation rate (%) on chicken patties, thermally treated at two-plated grill

Parameter	Obogatitev	Atmosfera v embalažnih enotah				<i>p</i> _F (SEM)
		MAP–hCO ₂	WF–lCO ₂	MAP–hO ₂	MAP–lO ₂	
skupni OH	običajen	5,91 ^{BCb}	12,83 ^{Bb}	97,31 ^A	1,08 ^{Cb}	*** (7,49)
	<i>n</i> -3	8,63 ^{BCa}	20,69 ^{Ba}	101,02 ^A	4,56 ^{Ca}	*** (12,1)
	<i>p</i> _E (SEM)	** (1,24)	** (3,17)	nz (20,2)	*** (0,76)	
holesterol	običajen	573,34 ^A	567,46 ^A	493,94 ^B	578,36 ^A	*** (95,1)
	<i>n</i> -3	570,35 ^A	562,90 ^A	497,34 ^B	577,92 ^A	*** (12,8)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (3,62)	nz (8,83)	nz (19,2)	nz (4,73)	
oksidacija (%)	običajen	1,0 ^{BCb}	2,2 ^{Bb}	16,3 ^A	0,2 ^{Cb}	*** (1,23)
	<i>n</i> -3	1,5 ^{BCa}	3,5 ^{Ba}	16,9 ^A	0,8 ^{Ca}	*** (1,99)
	<i>p</i> _E (SEM)	** (0,3)	** (0,5)	nz (3,42)	*** (0,1)	

Legenda: glej preglednico 35; legend: see table 35

Prikazani rezultati od poglavja 4.4.1 do 4.4.5 so že objavljeni v Penko in sod. (2015) ter delno v magistrskem delu Kakoviča (2013).

4.4.6 Heterociklični aromatski amini

V splošnem lahko, glede na rezultate prikazane v preglednici 38 in prilogi D.2, ugotovimo da je količina posameznih in skupnih HAA praviloma nekoliko večja v *n*-3–obogatenih sekljancih v primerjavi z običajnimi, čeprav te razlike niso statistično značilne ($p > 0,05$). Do sedaj tudi še niso znane raziskave in podatki, ki bi proučevali in pokazali vpliv *n*-3–obogatitve mesa na tvorbo HAA.

Vpliv sestave atmosfere v embalažnih enotah na tvorbo posameznih in skupnih HAA v sekljancih je statistično zelo visoko značilen in obratno sorazmeren s količino nastalih OH pri istovrstnem pakiranju. Tako je količina skupnih HAA najvišja pri obeh skupinah sekljancev (običajnih in *n*-3–obogatenih) pakiranih v atmosfero z zelo majhno koncentracijo O₂ (MAP–lO₂; O₂ < 0,1 %). Nekoliko manjša, vendar dokaj primerljiva, je količina HAA v primeru pakiranja s povečano koncentracijo CO₂ v atmosferi (MAP–hCO₂). Nasprotno pa se je 2-krat oz. 3-krat manj HAA tvorilo pri obeh skupinah sekljancev, ki so bili pakirani v atmosfero z majhno koncentracijo CO₂ (WF–lCO₂) oz. veliko koncentracijo O₂ (MAP–hO₂; O₂ > 80 %).

Če primerjamo posamezne HAA lahko vidimo, da največji delež k skupnim HAA, ne glede na sestavo atmosfere, prispevata MeIQx in PhIP, presenetljivo visok delež pa predstavljata tudi harman in norhraman (glej preglednico 38 in prilogo D.2).

V okviru določanja HAA smo določali tudi vsebnost kreatina/kreatinina, ki je eden ključnih prekursorjev za tvorbo HAA, predvsem aminoimidazoazarenov (AIA) oz. »termičnih« HAA, ki se tvorijo pri temperaturah običajnih za klasične postopke toplotne obdelave mesa,

t.j. pri temperaturi 150–250 °C (Sugimura in Adamson, 2000; Murkovic, 2004). Pri tem tipu HAA je kreatin/kreatinin odgovoren za tvorbo t.i. amino-imidaznega dela molekule, ki je bistven za mutagenost (Skog in sod., 1998; Sugimura in Adamson, 2000; Kizil in sod., 2011). Pri tem velja, da količina kreatina/kreatinina ne vpliva na končno količino HAA, ampak vpliva predvsem na mutagenost. V našem poskusu se je pokazalo, da je bila količina HAA celo večja pri tistih sekljancih, ki so vsebovali manj keatina/kreatinina.

Preglednica 38: Vpliva dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3–obogatitev) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osemdnevnim skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C na vsebnost prekursorjev HAA (mMol/kg) presnih sekljancev ter vsebnost skupnih HAA (µg/kg) po pečenju sekljancev na dvoploščnem žaru

Table 38: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and different package-atmosphere conditions during 8 days of storing at (4 ±1) °C on content of HAA precursors (mMol kg⁻¹) in raw, as well as total HAA content (µg kg⁻¹) of chicken patties, thermally treated at two-plated grill

Parameter	Obogatitev	Atmosfera v embalažnih enotah				<i>p_P</i> (SEM)
		MAP–hCO ₂	WF–ICO ₂	MAP–hO ₂	MAP–IO ₂	
MeIQx	običajen	6,116 ^A	3,303 ^{AB}	0,872 ^B	6,717 ^A	* (5,302)
	<i>n</i> -3	5,489 ^A	2,946 ^{AB}	1,394 ^B	5,390 ^A	* (4,222)
	<i>p_E</i> (SEM)	nz (5,588)	nz (3,703)	nz (1,292)	nz (5,910)	
PhIP	običajen	4,100 ^A	1,568 ^{AB}	0,611 ^B	3,856 ^{AB}	nz (4,155)
	<i>n</i> -3	3,091 ^{AB}	1,344 ^B	1,069 ^B	5,182 ^A	* (3,848)
	<i>p_E</i> (SEM)	nz (4,395)	nz (1,432)	nz (0,594)	nz (5,979)	
vsota	običajen	17,509 ^{Aa}	7,856 ^B	6,492 ^B	18,170 ^A	*** (5,067)
	<i>n</i> -3	14,651 ^{Bb}	8,115 ^C	6,831 ^C	18,119 ^A	*** (4,104)
	<i>p_E</i> (SEM)	* (3,897)	nz (3,579)	nz (2,741)	nz (6,542)	

Legenda: glej preglednico 35; legend: see table 35

4.4.7 Vrednotenje senzoričnih lastnosti

Deskriptorji, kot so barva, vonj in aroma, so v nalogi definirani tako, da so pokazatelji poslabšanja senzorične kakovosti in sprejemljivosti piščančjih sekljancev. Iz preglednice 39 lahko razberemo vpliva različne sestave atmosfere v embalažni enoti in *n*-3 obogatitve piščančjega mesa na senzorične lastnosti piščančjih sekljancev.

Barva končnega izdelka je pomemben dejavnik, na podlagi katerega se potrošniki odločajo za nakup. Ugotovili smo, da se barva presnih običajnih sekljancev poslabša (> 0 točk) v večjem obsegu kot pri *n*-3–obogatenih vzorcih ($p \leq 0,001$).

Kot je razvidno iz preglednice 39 način pakiranja oz. sestava atmosfere značilno vpliva ($p \leq 0,001$) na oksidiranost barve tako pri običajnih kot *n*-3–obogatenih sekljancih. Največje poslabšanje barve površine presnih sekljancev po osemdnevnem skladiščenju so preskuševalci zaznali pri sekljancih pakiranih v embalažne enote z majhno koncentracijo O₂ (MAP–IO₂). Večinoma so barvo opisali kot sivo, v nekaterih primerih pa so poslabšanje ocenili celo z limitno vrednostjo (4), ki pomeni popolnoma oksidirano barvo. V drugih primerih, največkrat pri sekljancih pakiranih v največje koncentracije O₂ (MAP–hO₂), pa so poslabšanje barve opisali kot neizraženo ali rahlo izraženo (od 0,3 to 0,9). Zanimivo, kot najbližje optimalni svetlo rdeči (oksidirani) barvi so bili ocenjeni sekljanci pakirani v mešanico plinov, ki je najbližje atmosferskemu zraku (WF–ICO₂).

Razlike v instrumentalno merjeni barvi so potrdili tudi preskuševalci, vključeni v senzorično analizo. Senzorični panel je ugotovil predvsem primerljive razlike v poslabšanju barve med različnimi atmosferami v embalažnih enotah, prav tako pa tudi razlike med običajnimi in *n*-3–obogatimi sekljanci.

Preglednica 39: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3–obogatitev) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osem dnevnim skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C na senzorične lastnosti sekljancev po pečenju na dvoploščnem žaru

Table 39: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and different package-atmosphere conditions during 8 days of storing at (4 ±1) °C on sensory properties of chicken patties, thermally treated at two-plated grill

Senzorične lastnosti (0–4)	Obogatitev	Atmosfera v embalažnih enotah				<i>p_P</i> (SEM)
		MAP–hCO ₂	WF–ICO ₂	MAP–hO ₂	MAP–IO ₂	
poslabšanje barve	običajen	0,8 ^C	0,3 ^D	0,9 ^{Ba}	3,1 ^{Aa}	*** (0,3)
	<i>n</i> -3	0,8 ^B	0,3 ^D	0,5 ^{Cb}	2,7 ^{Ab}	*** (0,5)
	<i>p_E</i> (SEM)	– (0,3)	nz (0,3)	*** (0,4)	*** (0,7)	
tuji vonji	običajen	0,5 ^{Ba}	0,8 ^A	0,6 ^{Ba}	0,6 ^{ABa}	*** (0,5)
	<i>n</i> -3	0,2 ^{Bb}	1,0 ^A	0,3 ^{Bb}	0,3 ^{Bb}	*** (0,6)
	<i>p_E</i> (SEM)	*** (0,5)	nz (0,7)	*** (0,4)	*** (0,4)	
žarkost	običajen	0,0 ^C	1,1 ^B	1,6 ^{Ab}	0,0 ^C	*** (0,5)
	<i>n</i> -3	0,0 ^C	1,1 ^B	2,4 ^{Aa}	0,0 ^C	*** (0,5)
	<i>p_E</i> (SEM)	– (-)	nz (0,6)	*** (0,8)	nz (0,0)	
WOF	običajen	0,2 ^{Ca}	1,1 ^{Bb}	1,5 ^A	0,2 ^{Ca}	*** (0,5)
	<i>n</i> -3	0,0 ^{Bb}	1,5 ^{Aa}	1,5 ^A	0,0 ^{Bb}	*** (0,5)
	<i>p_E</i> (SEM)	** (0,2)	*** (0,6)	nz (0,8)	*** (0,2)	
tuje arome	običajen	0,4 ^{Ba}	0,9 ^{AB}	0,5 ^{Ba}	0,5 ^{Ba}	*** (0,4)
	<i>n</i> -3	0,2 ^{Cb}	1,2 ^{AA}	0,2 ^{BCb}	0,3 ^{Bb}	*** (0,4)
	<i>p_E</i> (SEM)	*** (0,4)	* (0,6)	*** (0,4)	* (0,4)	

Legenda: glej preglednico 35; legend: see table 35

Aroma je zelo pomemben parameter senzorične kakovosti vsakega živila. Aroma izhaja iz kombinacije vonja, okusa in občutka v ustih, zaradi tega je hrana tudi privlačna za potrošnike. Iz podatkov je razvidno, da različna sestava atmosfere v embalažni enoti in *n*-3–obogatitev piščančjega mesa vplivata značilno na ocenjene deskriptorje arome in vonja. Med oksidativnim razpadom *n*-3 MK nastajajo različne hlapne sestavine, ki jih lahko opišemo z izrazom po ribah (vonj) in tuje arome, ki so značilne za meso piščancev krmljenih z *n*-3 MK (Rymer in Givens, 2005). Zato smo pričakovali, da bodo preskuševalci v tej študiji zaznali bolj izraženo žarkost in tuje arome v *n*-3–obogatenih sekljancih. Tuje arome so preskuševalci opisovali z izrazi, kot so kislo ali pokvarjeno v običajnih sekljancih, kar se je rahlo izrazilo pri vseh načinih pakiranja, najbolj pri WF-ICO₂, oziroma rahlo po lanenem olju ali ribah pri *n*-3–obogatenih sekljancih, kar je lahko posledica peroksidacije VNМК (Woods in Fearon, 2009), kar je bilo tudi najbolj izraženo v primeru WF-ICO₂.

Aromo po postanem (WOF, *Warm Over Flavour*) so preskuševalci prav tako vrednotili na pečenih sekljancih, vrednosti so bile rangirane med 0 in 1,5, kar ustreza izrazu 'ni izražena' do 'rahlo izražena'. Čeprav so bili indikatorji oksidacije lipidov (TBK) v pečenih *n*-3–obogatenih sekljancih značilno večji kot pri običajnih, pa preskuševalci niso zaznali bistvenih razlik v aromi po postanem med obema skupinama sekljancev.

Poslabšanje vonja in arome ter prisotnost žarkosti so bili najbolj zaznani v sekljancih, pakiranih v atmosfero z veliko O₂ (MAP-hO₂ in WP-ICO₂), najmanj pa v sekljancih, pakiranih v atmosfero z majhno koncentracijo O₂ (MAP-IO₂), in sicer tako pri običajnih kot *n*-3-obogatenih sekljancih. Velja poudariti, da je senzorični panel ugotovil večje poslabšanje senzoričnih lastnosti *n*-3-obogatenih sekljancev kot pa običajnih, predvsem pri senzorični oceni žarkosti. V *n*-3-obogatenih sekljancih v atmosferi z veliko O₂ (MAP-hO₂) so preskuševalci žarkost ocenili z 2,4, kar je ekvivalent izrazu 'srednje (bolj) izražena' do 'močno izražena'.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Naloga je bila razdeljena v štiri sklope oz. medsebojno neodvisne manjše poskuse, katerih osnovni namen je bil ugotoviti predvsem vpliv dodatka različnih rastlinskih ekstraktov na preprečevanje nezaželenih oksidativnih procesov ter tvorbe karcinogenih heterocikličnih aromatskih aminov (HAA) v običajnem in *n*-3–obogatenem piščančjem mesu in sekljancih.

Poleg vpliva dodatka različnih rastlinskih ekstraktov smo v nalogi istočasno zajeli tudi druge dejavnike, za katere smo na osnovi predhodnih raziskav sklepali, da imajo lahko določen vpliv na te nezaželene procese. Ti dejavniki so: čas skladiščenja, način pakiranja (sestava atmosfere), način toplotne obdelave in stopnja pečenosti ter vrsta nosilca ekstrakta.

Pri sami nalogi smo precej pozornosti posvetili tudi vplivu *n*-3–obogatitve krme piščancev, ki se odraža na povečani vsebnosti *n*-3 večkrat nenasičene maščobne kisline (VNMK) v mesu, na pojav teh nezaželenih procesov. Nobena od do sedaj opravljenih raziskav tudi še ni obravnavala vpliva *n*-3–obogatitve mesa na tvorbo HAA, kar pomeni pomemben prispevek naloge k razvoju znanosti.

Dejstvo je, da se je v zadnjem obdobju v skrbi za bolj zdravo življenje med potrošniki zelo povečalo zanimanje za uživanje živil bogatih z *n*-3 VNMK, saj je bilo že večkrat dokazano, da imajo le-te pozitivne učinke na človeški organizem. Na drugi strani pa imajo to slabost, da so zelo podvržene oksidacijskim procesom in v skladu s predhodnimi raziskavami smo pričakovali povečano stopnjo oksidacije pri *n*-3–obogatenem mesu. Hidroperoksidi in ostali prosti radikali, ki se generirajo med oksidacijo lipidov VMNK naj bi bili ob tem odgovorni tudi za iniciacijo oksidacije holesterola in s tem tvorbo oksidov holesterola (OH), ki dokazano *z in vitro* in *in vivo* poskusi delujejo citotoksično, mutageno in celo karcinogeno, ter jih tako povezujejo z razvojem sodobnih civilizacijskih bolezni, kot so ateroskleroza in razna rakava obolenja (Souza in Silva, 2006; Hur in sod., 2007). Nekatero raziskavo so pokazale celo povezavo med oksidacijo lipidov in tvorbo mutagenih in karcinogenih (HAA). Lipidi in njihovi produkti oksidacije se namreč na različne načine lahko vključujejo v Maillardovo reakcijo (Farmer in Mottram, 1990) in na tak način z interakcijami vplivajo na tvorbo HAA v mesnih proizvodih (Faulkner, 1994; Johansson, 1995). Znano je, da sam proces oksidacije lipidov, poleg tvorbe zdravju škodljivih produktov, povzroči tudi negativne spremembe senzoričnih lastnosti, predvsem barve in arome, ki ključno vplivata na potrošnikovo odločitev za nakup proizvoda.

V izogib vsem nezaželenim spremembam se v industriji uporabljajo različni dodatki, predvsem t.i. sintetični antioksidanti (BHA, BHT...), ki dokazano učinkovito zavirajo te procese. Vendar zaradi vedno večje ozaveščenosti potrošnikov, ki težijo po »naravnem«, so se začele iskati alternative za zamenjavo sintetičnih dodatkov z naravnimi. Znano je, da so številni rastlinski materiali bogat vir polifenolnih spojin z močnim antioksidativnim delovanjem in v tem primeru predstavljajo zelo dobro alternativo. Tako smo se na osnovi že znanih dejstev o pozitivnih vplivih različnih rastlinskih ekstraktov na preprečevanje nezaželenih procesov v okviru naloge osredotočili predvsem na pridobivanje in karakterizacijo ekstraktov ter njihov vpliv na preprečevanje tvorbe nezaželenih in zdravju

škodljivih produktov med skladiščenjem in toplotno obdelavo, tako pri običajnem kot *n-3*-obogatenem piščančjem mesu.

5.1.1 Maščobnokislinska sestava

Vsi poskusi, ki smo jih izvedli v okviru disertacije, so potekali vzporedno na običajnem in *n-3*-obogatenem piščančjem mesu (fileju) oz. sekljancih iz tega mesa. Najprej smo izvedli karakterizacijo oz. določili maščobnokislinski (MK) profil obeh skupin (običajen, *n-3*-obogaten). V sklopu II smo določali MK profil piščančjemu fileju, ki smo ga nato uporabili v nadaljevanju sklopa II in III, medtem ko smo v sklopu IV določili MK profil komercialnih piščančjih sekljancev.

Tako kot smo predpostavljali, smo pri *n-3*-obogatenem fileju oz. sekljancih določili večje koncentracije *n-3* MK in ugodnejše razmerje *n-6/n-3* kot pri običajnih. Delež *n-3* VNMK je bil v primeru *n-3*-obogatenega fileja (4,53 g/100 g) in sekljancev (4,36 g/100 g) več kot 2-krat večji kot pri običajnem fileju (1,87 g/100 g) oz. sekljancih (2,07 g/100 g). K povečanju deleža *n-3* VNMK je v obeh primerih največ doprinesla ALA, in s tem tudi k izboljšanju razmerja *n-6/n-3*. Sicer pa je bil delež ALA v *n-3*-obogatenih sekljancih v našem poskusu nekoliko manjši kot v triacilglicerolnih frakcijah mesa piščancev, krmljenih z lanenim semenom, v poskusu, ki so ga opravili Betti in sod. (2009b). Nasprotno sta deleža DPA in DHA v našem primeru večja.

Podobno kot v večini ostalih študij (Crespo in Esteve-Garcia, 2002; Shen in sod., 2005; Zelenka in sod., 2008) lahko tudi v našem primeru ugotovimo, da je med dolgoveržnimi *n-3* VNMK prevladujoča dokozapentaenojska kislina (DPA). Kar pa je popolnoma v nasprotju z ugotovitvami Lopez-Ferrer in sod. (2001), ki so v svojih vzorcih določili, da je najbolj zastopana dokozahexaenojska kislina (DHA), te pa je v naših filejih oz. sekljancih povprečno 60 % manj kot DPA.

Zaradi večjega deleža *n-3* VNMK se v *n-3*-obogatenem fileju oz. sekljancih bistveno izboljša tudi razmerje *n-6/n-3* (file: 4,53:1; sekljanci: 4,36:1) in tako dosega tisto optimalno ugodno razmerje 4:1, ki se smatra kot ugodno z vidika zdravja, saj se na tak način precej zmanjša tveganje za razvoj različnih degenerativnih bolezni (srčno-žilne, rakava obolenja...) (Enser in sod., 2001).

5.1.2 Oksidacijski produkti

Na eni strani *n-3*-obogatitev pozitivno vpliva na povečan delež *n-3* VNMK, ki imajo ugoden vpliv na zdravje, hkrati pa to pomeni tudi večjo izpostavljenost teh živil nezaželenim oksidativnim procesom, ki v končni fazi pomenijo tudi tvorbo zdravju škodljivih produktov. Poleg *n-3*-obogatitve smo obravnavali tudi druge dejavnike, ki pomembno vplivajo na vrednost števila tiobarbiturne kisline (TBK) in vsebnost oksidov holesterola (OH) ter senzorične spremembe povezane z oksidacijskimi procesi.

Število tiobarbiturne kisline (TBK)

Pričakovali smo, da predvsem *n-3*-obogatitev vpliva na povečanje TBK, kar se je deloma tudi potrdilo, in sicer v primeru sekljancev (sklop IV). V tem primeru je bilo število TBK pri *n-3*-obogatenih sekljancih povprečno do 68 % večje kot pri običajnih. Tudi Betti in sod. (2009a) pišejo, da na oksidativno stabilnost mesa brojlerjev močno vpliva koncentracija in

čas krmljenja le-teh z lanenim semenom, kar je seveda pogojeno tudi s količino na novo akumuliranih *n*-3 VNMK v njihovem mesu. Nadalje dodajajo, da že štiridnevno dodajanje lanenega semena v prehrano brojlerjev izzove višjo stopnjo oksidacije (večje število TBK) kasneje v mesu prsi in beder.

n-3-obogateni sekljanci imajo večjo vsebnost ALA v primerjavi s običajnimi, ta pa je kot vsi nenasičeni lipidi bolj občutljiva na oksidacijo, katere posledica je nastanek peroksidov in aldehydov (Leskanich in Noble, 1997). Še več, ne le vsebnost *n*-3 VNMK v sekljancih, ampak tudi majhna vrednost pH le-teh (Chae in sod., 2007) zaradi dodatka nekaterih komponent v komercialne sekljance (npr. natrijevega acetata, askorbinske kisline) lahko predstavlja dodaten vpliv, ki poveča dovzetnost sekljancev za oksidacijo. Analizirane vrednosti pH vseh naših vzorcev so relativno visoke ($6,40 \pm 0,19$).

Ena od možnih razlag, zakaj v *n*-3-obogatenem mesu poteka obsežna oksidacija lipidov je lahko oblikovanje kisikovih reaktivnih zvrsti (ROS), ki nastanejo kot posledica nalaganja *n*-3 VNMK (Morrissey in sod., 1998). Tvorba je povezana s prehodnimi kovinami, kot je železo, ki aktivirajo ciklično adenozin monofosfat proteinsko kinazo (cAMP), povečanim sproščanjem kalcija iz sarkoplazemskega retikuluma in veliko vsebnostjo VNMK v fosfolipidnih membranah (Betti in sod., 2009a).

Nasprotno pa v primeru presnih mariniranih mini filejev (sklop III) nismo ugotovili značilnega vpliva *n*-3-obogatitve na povečan obseg oksidacije in s tem povečano število TBK. Očitno se je v tem primeru pokazal antioksidativni učinek dodanega ekstrakta brinovih jagod, poleg tega pa pri tem tudi ni bilo vpliva mletja in sekljanja, ki pri sekljancih poveča stopnjo oksidacije. Pri razdevanju, še posebej pa pri mletju, namreč pride do porušanja celičnih struktur ter povečanja površine, ki reagira s kisikom (Honikel, 2009; Faustman in sod., 2010).

V vseh primerih, ko smo dodali ekstrakt brinovih jagod, se je število TBK zmanjšalo, najbolj izrazito v primeru vezave ekstrakta na sol oz. škrob. Brinove jagode so bogat vir predvsem fenolnih kislin, med katerimi so Miceli in sod. (2011) ter Taviano in sod. (2013) ugotovili, da je najbolj zastopana protokatehinska kislina, ki je poznana kot močan lovilec prostih radikalov. Protokatehinska kislina je prisotna tudi v našem primeru, vendar je zastopana v manjšem deležu kot galna kislina.

Znano je, da postopki toplotne obdelave močno pospešijo procese oksidacije in v primerjavi s presnim mesom posledično povzročijo večje povečanje števila TBK. Po ugotovitvah Min in sod. (2008) naj bi bil vpliv toplotne obdelave na povečanje števila TBK pri različnih vrstah mesa najbolj izrazit pri piščančjem mesu. Ključno vlogo pri oksidativnih procesih toplotno obdelanega mesa naj bi imel predvsem delež VNMK, ki je med vsemi vrstami mesa največji prav v piščančjem mesu. To lahko potrdimo tudi z našim poskusom, saj je število TBK po toplotni obdelavi izrazito povečalo predvsem v *n*-3-obogatenih mariniranih mini filejih. Tako se je pri toplotno obdelanih *n*-3-obogatenih mariniranih mini filejih število TBK povečalo od 185 % do 375 % v primerjavi s presnimi. Pri tem lahko ugotovimo tudi pomemben vpliv nosilca ekstrakta, saj se število TBK po toplotni obdelavi *n*-3-obogatenih mini filejev najbolj poveča v primeru uporabe olja kot nosilca. Izkazalo pa se je tudi, da ima v primeru toplotno obdelanih mini filejev dodatek ekstrakta celo prooksidativen učinek. Pospešen proces oksidacije zaradi toplotne obdelave se je odrazil

tudi s pojavom t.i. arome po postanem oz. WOF (iz angl. *Warm Over Flavour*), ki je najbolj izražena pri kontrolni marinadi (brez dodanega ekstrakta brinovih jagod), pri kateri je tudi število TBK največje. Vrednost števila TBK in intenziteta arome WOF sta največja pri pečenju v pečici, najmanjša pa pri pečenju na žaru. To je povezano predvsem s časom in temperaturo toplotne obdelave, saj višja temperatura in krajši čas, kar smo dosegli pri pečenju na žaru, upočasnita oksidacijske procese. Pri tem se namreč zniža aktivacijska energija za oksidacijo in s tem je ovirana pretvorba hidroperoksida v proste radikale, ki stimulirajo oksidacijske procese (Bastida in sod., 2009).

V primeru marinade, kjer je ekstrakt vezan na olje, pride do precej močno izraženih tujih vonjev in arom po brinu, ki prekrijejo značilno aromo mesa. S časom skladiščenja se ta tuja aroma rahlo izgublja, saj jo prekrije aroma WOF, ki se nasprotno, s časom intenzivira.

Podrobno smo proučevali tudi vpliv načina pakiranja in tako v primeru sekljancev kot tudi mariniranih mini filejih ugotovili, da je število TBK najnižje v embalažnih enotah z najmanjšimi koncentracijami O₂. Pri mariniranih mini filejih se je izkazalo, da je vakuumsko pakiranje zelo učinkovito predvsem pri *n-3*-obogatenih mini filejih, saj se število TBK v primerjavi s pakiranjem v modificirano atmosfero zmanjšalo od 20 % pri kontrolni marinadi pa vse do 68 % v primeru vezave brinovega ekstrakta na olje. V primeru analize toplotno obdelanih mini filejev pa lahko ugotovimo ravno nasproten vpliv pakiranja kot pri presnih, saj so povprečne vrednosti števila TBK večje v primeru pakiranja v vakuum. Podobno kot pri presnih je tudi tu vpliv načina pakiranja najbolj izrazit pri *n-3*-obogatenih mini filejih, kjer smo v marinadi kot nosilec uporabili olje, vendar v tem primeru je bistveno bolj učinkovito pakiranje v modificirano atmosfero, saj je število TBK za 171 % manjše v primerjavi z vakuumom.

Pri komercialnih sekljancih smo največje povečanje oksidacije lipidov med osemdnevним skladiščenjem v hladilniku ugotovili v zavitkih z veliko O₂ (MAP-hO₂). Manj kot je v embalažnih enotah O₂, manjše število TBK v sekljancih. Število TBK je torej značilno najnižje v enotah, zavitih v propustno folijo (WF-lCO₂) ali polnjenih z 20 % O₂ in 30 % CO₂ (MAP-hCO₂), kot v enotah z največjo koncentracijo O₂ (MAP-hO₂); še več, najnižje število TBK smo ugotovili v enotah z O₂ manj kot 0,5 % (MAP-lO₂).

Conchillo in sod. (2003) so študirali oksidacijo lipidnih frakcij v presnih in pečenih piščančjih prsih, skladiščenih 0 do 6 dni pri temperaturi 4 °C. Ugotovili so, da aerobno hranjenje poviša število TBK od 0,04 do 0,06 ppm za presne vzorce in od 0,21 do 1,20 ppm za pečene vzorce.

Oksidi holesterola

Poleg števila TBK je dober pokazatelj oksidacijskih procesov v mesu tudi količina nastalih OH, katerih tvorba je tesno povezana z oksidacijo MK, saj sta mehanizma oksidacije lipidov in holesterola medsebojno povezana. Osada in sod., (1993) so z modelnimi poskusi dokazali, da pride do tvorbe OH samo v primeru, ko holesterol segrevamo skupaj z maščobnimi kislinami.

Dostopnih je več študij, ki so se fokusirale na vpliv različnih toplotnih postopkov na tvorbo različnih OH, v njih navajajo bolj ali manj opazno povečanje njihove vsebnosti po toplotni obdelavi (Conchillo in sod., 2003; Bonoli in sod., 2007; Vicente in Torres, 2007). Prav tako

smo v študijah zasledili, da presno meso oz. izdelki lahko vsebujejo OH (Rodriguez-Estrada in sod., 1997) in da toplotna obdelava lahko poveča vsebnost OH. Tako smo v sklopu III proučevali vpliv časa skladiščenja in mariniranja na tvorbo OH v presnih mariniranih mini filejih, medtem ko smo v sklopu IV proučevali vpliv toplotne obdelave piščančjih sekljancev po osemdnevnem skladiščenju pri različni atmosferi v embalažnih enotah.

Glede na to, da sta ta dva poskusa medsebojno neodvisna, težko potegnemo povezave med njima in so rezultati glede OH težko neprimerljivi. Zato tudi ne moremo popolnoma razložiti dejstva, da so količine OH pri presnih mariniranih mini filejih celo višje kot pri toplotno obdelanih komercialnih sekljancih brez dodanega ekstrakta. Možna razlaga za ta pojav je lahko sicer ta, da gre pri komercialnih sekljancih za nadaljnjo stopnjo oksidacije, pri čemer se tvorijo 7-KC in epoksidi, ki jih v raziskavi nismo določali. Sicer pa velja, da so tudi podatki v literaturi zelo različni in jih posledično tudi težko primerjamo z našimi. Razlog je v tem, da je kvantitativna določitev OH zelo problematična zaradi zelo majhnih koncentracij (*ppm*), poleg tega pa samo izolacijo ovira bistveno večja vsebnost holesterola, triacilglicerov, fosfolipidov in ostalih lipidov v živilu (Valenzuela in sod., 2003).

Podobno kot pri stopnji oksidacije MK, ki smo jo izrazili s številom TBK, lahko tudi pri določanju količine nastalih OH potrdimo negativen vpliv *n*-3-obogatitve tako pri mariniranih mini filejih kot pri sekljancih. Podobno trdijo Belitz in sod. (2009) ter Echarte in sod. (2003), ki so tudi pokazali, da je oksidacija holesterola obsežnejša v piščančjem mesu z večjo vsebnostjo VNMK, predvsem α -linolenske kisline, ki tudi v našem primeru prevladuje.

Pri presnih mariniranih mini filejih, kjer vpliv *n*-3-obogatitve na število TBK ni bil značilen, je bistveno bolj do izraza prišlo povečanje količine OH, saj se je pri vseh marinadah tvorilo od 25 do 62 % več OH kot pri običajnih mini filejih. Izjema je bila v tem primeru marinada, kjer je bil ekstrakt brinovih jagod vezan na škrob. V tem primeru se je količina skupnih OH v *n*-3-obogatenih mini filejih zmanjšala kar za 65 % glede na običajne.

Presenetljiva je ugotovitev, da je količina skupnih OH pri običajnih in *n*-3-obogatenih mini filejih zadnji (deveti) dan skladiščenja najmanjša pri kontrolni marinadi, kar je nekako v nasprotju s pričakovanji. Ta pojav je najverjetneje posledica napredovane oksidacije ter tvorbe 7-KC in sekundarnih produktov oksidacije holesterola, kot so epoksidi, ki jih v naši raziskavi žal nismo določali, ker nismo imeli potrebnih standardov.

Pri komercialnih sekljancih smo poleg značilnega negativnega vpliva *n*-3-obogatitve podrobno obravnavali tudi vpliv atmosfere v embalažni enoti med skladiščenjem. V tem primeru se je pokazala značilna povezava med številom TBK in količino nastalih OH, saj obe vrednosti naraščata s koncentracijo O₂ v embalažni enoti.

V tem sklopu smo ugotovili povezavo med številom TBK in oblikovanimi OH ($r = 0,6841$; $p < 0,0001$), kar podpira naša pričakovanja, da bodo peroksidni radikali nastali pri oksidaciji VNMK fosfolipidov povzročili začetek oksidacije holesterola (Paniangvait in sod., 1995).

Poudariti moramo, da smo ugotovili značilne razlike v vsebnosti OH med običajnimi sekljanci in *n*-3-obogatenimi sekljanci v embalažnih enotah MAP-hCO₂, WP-ICO₂ in

MAP-IO₂. Povprečne vsebnosti za posamezne in skupne OH so namreč v *n*-3-obogatenih sekljancih pri teh načinih pakiranja statistično značilno večje kot v običajnih, izjema je le pakiranje v atmosferi bogati s O₂ (MAP-hO₂), ko je razlika neznačilna. Rezultat je bil pričakovan zaradi povečane oksidacije holesterola v piščančjih sekljancih z zmanjšano oksidacijsko stabilnostjo in se sklada z ugotovitvami Luciano in sod. (2013), ki je določil, da 20 % dodatek lanenega semena v prehrano ovac spodbudi oksidacijo maščobnih kislin in holesterola v samem mesu.

Največje vrednosti števila TBK ter vsebnost OH smo tako določili pri sekljancih pakiranih v MAP-hO₂, in sicer se je v tem primeru po toplotni obdelavi tvorilo kar 8-krat več OH kot pri sekljancih pakiranih v MAP-IO₂. S tem lahko potrdimo ugotovitve različnih avtorjev (Cayuela in sod., 2004; Ubhayasakera in sod., 2004; Conchillo in sod., 2005; Otaegui-Arrazola in sod., 2010), da velika koncentracija O₂ v embalažnih enotah deluje prooksidativno in tako pospešuje oksidacijo lipidov in holesterola.

Vpliv atmosfere v embalažnih enotah na tvorbo OH smo potrdili tudi v primeru mariniranih mini filejev, kjer se je vakuumsko pakiranje (<1 % O₂) pokazalo kot zelo učinkovito pri preprečevanju oksidacijskih procesov v primerjavi s pakiranjem v modificirano atmosfero (MAP-hCO₂; 20 % O₂). Še posebej izrazit je bil vpliv pakiranja v vakuum v primeru uporabe olja kot nosilca ekstrakta, saj smo poleg zmanjšanja števila TBK dosegli tudi zmanjšanje stopnje oksidacije in količine nastalih skupnih OH v primerjavi s pakiranjem v modificirano atmosfero. Količina skupnih OH se je pri vakuumsko pakiranih običajnih mini filejih tako zmanjšala za 4,1-krat, pri *n*-3-obogatenih pa celo za 4,4-krat glede na pakirane v MAP-hCO₂.

Na osnovi vrednosti, ki opredeljujejo stopnjo oksidacije (število TBK, stopnja oksidacije holesterola, skupni OH), lahko sklepamo, da je kot nosilec ekstrakta najbolj primeren škrob. Kot najbolj primeren način pakiranja se je potrdilo pakiranje z majhno koncentracijo O₂ ter pečenje na žaru med postopki toplotne obdelave.

5.1.3 Barva površine in senzorične lastnosti

Instrumentalno merjenje barve površine

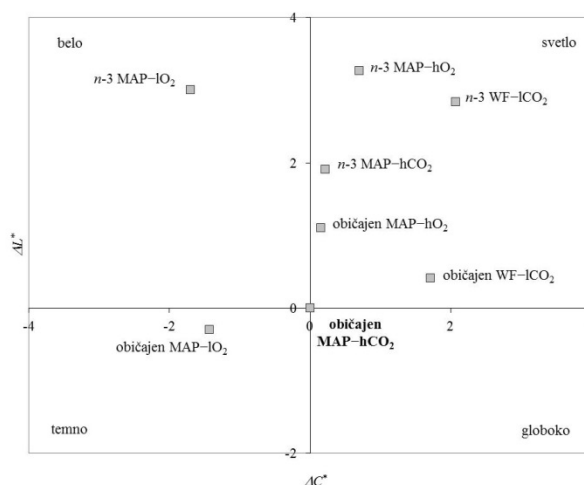
Z namenom, da bi ugotovili morebitni vpliv časa in pogojev (atmosfera) skladiščenja smo v sklopu III in IV opravili tudi instrumentalno merjenje barve površine.

V primeru mariniranih mini filejev smo ugotovili, da čas skladiščenja vpliva predvsem na vrednost a^* , ki vrednoti intenziteto rdeče barve. Pri tem smo ugotovili, da se s časom skladiščenja, v primeru kontrolne marinade, vrednost a^* poveča, nasprotno pa se v primeru vezave ekstrakta na škrob oz. sol intenziteta rdeče barve zmanjša.

Iz meritev opravljenih na sekljancih smo izračunali vrednosti za spremembo svetlosti in nasičenosti, ΔL^* in ΔC . Na sliki 21 je prikazano, kako se spreminjata svetlost in nasičenost barve površine presnih sekljancev, pakiranih osem dni pri različnih atmosferah, v primerjavi z referenčnim pakiranjem, t.j. MAP-hCO₂ običajnih sekljancev. Podatki so nekoliko presenetljivi, saj kažejo, da je barva površine *n*-3-obogatenih presnih sekljancev opazno svetlejša (slika 21, *n*-3 MAP-hO₂, *n*-3 WF-ICO₂, *n*-3 MAP-hCO₂), celo bolj bleda (slika 21, *n*-3 MAP-IO₂) kot pri običajnih sekljancih (slika 21, običajen), ne glede na atmosfero.

Možna razlaga je lahko nekoliko večji delež $n-3$ VNMK v $n-3$ sekljancih, kar lahko vodi do večje refleksije svetlobnega žarka uporabljenega kromametra. Tudi Betti in sod. (2009a) so prišli do podobnih ugotovitev. Trdijo, da 16-dnevni dodatek lanenega semena v krmo piščancev (10 % in 17 %) poveča vrednosti L^* in a^* mesa prsi in beder v primerjavi s kontrolo – brez dodanega lanenega semena (prsi: 59,14 vs. 51,93, in 8,02 vs. 6,58; bedra: 56,25 vs. 53,43, in 8,91 vs. 6,70). Njihove ugotovitve se ujemajo z našimi samo za vrednost L^* , medtem ko za vrednosti a^* in b^* med $n-3$ in običajnimi sekljanci nismo našli statističnih razlik. Možen vzrok za to lahko pripišemo dodajanju karmina, barvila v sekljance. Tudi v primeru mariniranih mini filejev ne ugotavljamo bistvenega vpliva $n-3$ –obogatitve, čeprav so se predvsem pri kontrolni marinadi pojavile razlike. Tako je vrednost a^* oz. intenziteta rdeče barve večja pri $n-3$ –obogatenih mini filejih, podobno kot ugotavljajo Betti in sod. (2009).

Pri tem moramo poudariti tudi, da so bile naše meritve v primeru sekljancev narejene na površini sekljancev, medtem ko so Betti in sod. (2009a) opravili instrumentalno merjenje barve na piščančjih prsih in bedrih. Povsem nasprotno pa so ugotovili Singh in sod. (2011), ki so v perutninskih sekljancih, obogatenih s 3 % lanenega olja, izmerili manjše vrednosti L^* kot pri kontrolnih sekljancih, tistih brez dodanega lanenega olja.



Slika 21: Razlike v spremembi svetlosti (ΔL^*) in nasičenosti barve (ΔC^*) presnih piščančjih sekljancev, $n-3$ obogatenih in običajnih, hranjenih pri različnih atmosferah v embalažnih enotah 8 dni pri temperaturi (4 ± 1) °C; kont, meso piščancev krmljenih brez dodanega lanenega semena; $n-3$, meso piščancev, krmljenih z dodanim mletim lanenim semenom; WF-ICO₂, zavijanje v za zrak prepustno folijo, 21 % O₂, <1 % CO₂, 78 % N₂; MAP-hCO₂, 20 % O₂, 30 % CO₂, 50 % N₂; MAP-hO₂, 80 % O₂, 20 % CO₂; MAP-IO₂, <1 % O₂, 25 % CO₂, 74 % N₂

Figure 21: Differences in lightness (ΔL^*) and chroma (ΔC^*) of raw chicken patties, $n-3$ enriched and control, stored under different package atmosphere compositions and 8 days at temperature of (4 ± 1) °C. Cont, meat from chicken fed with a diet containing no flaxseed; $n-3$, meat from chicken fed with a diet containing ground whole flaxseed; WF-ICO₂, air-permeable wrapping, 21 % O₂, <1 % CO₂, 78 % N₂; MAP-hCO₂, 20 % O₂, 30 % CO₂, 50 % N₂; MAP-hO₂, 80 % O₂, 20 % CO₂; MAP-IO₂, <1 % O₂, 25 % CO₂, 74 % N₂

Barva običajnih in $n-3$ -obogatenih sekljancev, zavitih v za zrak prepustno folijo (WF-ICO₂: 21 % O₂, <1 % CO₂) po osmih dneh skladiščenja na površini postane bolj 'živahna' in svetla (slika 21) v primerjavi z običajnimi sekljanci skladiščenimi pri veliko CO₂ (MAP-hCO₂: 20 % O₂, 30 % CO₂). Obsežnejše oblikovanje MbO₂ (svetlordeče, češnjevo rdeče barve) na

površini mesa, pakiranega v zračno prepustne folije pri nizkih temperaturah skladiščenja opisujejo tudi Kizilirmak in sod. (2011). Še več, pakiranje in skladiščenje sekljancev pri še večjih koncentracijah O₂ (MAP-hO₂: 80 % O₂, 30 % CO₂) značilno spremeni barvo na površini, v primerjavi z MAP-hCO₂ postane svetlejša. Nasprotno pa barva na površini sekljancev v enotah z malo O₂ (<1 % O₂, 25 % CO₂), kot je MAP-IO₂, barva postane bolj bleda (*n*-3-obogateni, ΔL^* , 3,00 vs. 2,83) ali pa bolj siva in globoka (običajni, ΔL^* , -0,30 vs. -0,11) v primerjavi z MAP-hCO₂ (slika 21, L^*_{ref}), zaradi majhne količine zaostalega O₂ v embalažnih enotah. Temnejša barva zaradi majhne koncentracije O₂ je pričakovana, ker malo ali pa nič O₂ običajno povzroča, da barvilo preide v dezoksigenirano obliko, dezoksimioglobin (Belcher, 2006).

Vrednotenje senzoričnih lastnosti

V okviru vrednotenja senzoričnih lastnosti smo se osredotočili predvsem na vpliv dodatka ekstrakta brinovih jagod, časa skladiščenja, načina toplotne obdelave, *n*-3-obogatitve in sestave atmosfere pakiranja na poslabšanje barve, vonja in arome ter pojav žarkosti in arome WOF. Tako smo tudi s senzoričnim vrednotenjem potrdili ugotovitve kemijskih analiz, ki kažejo na oksidativne procese.

V primeru mariniranih mini filejev je prišlo do pojava izrazito tuje in neznačilne arome, ki so jo preskuševalci opisovali kot aromo »po rožah«, po brinu oz. kot grenko aromo, in je povezana z dodatkom ekstrakta brinovih jagod. To je bilo najmočnejše zaznati v primeru vezave ekstrakta na olje. Zelo podoben je bil negativen učinek olja kot nosilca ekstrakta tudi v primeru pojava tujih vonjev, čeprav ta vpliv ni bil tako izrazit.

Pokazalo se je, da ima pri sekljancih največji vpliv na poslabšanje senzoričnih lastnosti predvsem sestava atmosfere, medtem ko je vpliv *n*-3-obogatitve manjši.

V primeru ocenjevanja barve sekljancev smo celo ugotovili, da se barva presnih običajnih sekljancev poslabša (> 0 točk) v večjem obsegu kot pri *n*-3-obogatenih vzorcih ($p \leq 0,0001$). Nasprotno trdijo Azcona in sod. (2008), ki niso zasledili razlik v barvi kuhanega mesa prsi in beder (središčna temperatura, (75 ± 2) °C), pridobljenega iz piščancev, krmljenih na dva načina (koruza/soja kot kontrola vs. krma z veliko vsebnostjo sončničnih in lanenih semen z dostopom do cikorijskega ekstrakta), čeprav je v barvi tretirane skupine bil nekoliko povečan rumen odtенок in intenzivnost.

Največje poslabšanje barve površine presnih običajnih in *n*-3-obogatenih sekljancev po osemdnevnem skladiščenju so preskuševalci opazili pri sekljancih skladiščenih pri majhnih koncentracijah O₂ (MAP-IO₂). Tudi podatki iz literature potrjujejo naše ugotovitve, da večje koncentracije O₂ vedno vplivajo na boljšo sprejemljivost barve pri ocenjevalcih, kajti karakteristična rdeča barva mesa je posledica mesnega pigmenta v oksigenirani obliki (Luño in sod., 2006).

Pri sekljancih smo ugotovili, da različna sestava atmosfere v embalažni enoti in *n*-3-obogatitev piščančjega mesa vplivata značilno na ocenjene deskriptorje arome in vonja. Med oksidativnim razpadom *n*-3 MK nastajajo različne hlapne sestavine, ki jih lahko opišemo z izrazom po ribah (vonj) in tuje arome, ki so značilne za meso piščancev krmljenih z *n*-3 MK (Rymer in Givens, 2005). Zato smo pričakovali, da bodo preskuševalci v tej študiji zaznali bolj izraženo žarkost in tuje arome v *n*-3-obogatenih sekljancih. Tuje

arome so preskuševalci opisovali z izrazi, kot so kislo ali pokvarjeno v običajnih sekljancih oziroma rahlo po lanenem olju ali ribah pri *n*-3-obogatenih sekljancih, kar je lahko posledica peroksidacije VNMK (Woods in Fearon, 2009).

Aromo po postanem (WOF) so preskuševalci vrednotili na pečenih sekljancih, vrednosti so bile rangirane med 0 in 1,5, kar ustreza izrazu 'ni izražena' do 'rahlo izražena'. Čeprav so bili indikatorji oksidacije lipidov (TBK) v pečenih *n*-3-obogatenih sekljancih značilno večji kot pri običajnih sekljancih pa preskuševalci niso zaznali razlik v aromi po postanem. Ugotovitev je v nasprotju s predpostavkami Wilsona in sod. (1996), ki so poročali, da je perutninsko meso s povečano vsebnostjo dolgoveržnih *n*-3 VNMK bolj dovzetno za razvoj arome WOF in da je ta aroma posledica oksidacijskih procesov v toplotno obdelanem mesu že med kratkotrajnim skladiščenjem v hladilniku. Nekoliko bolj je aroma WOF prišla do izraza v primeru mariniranih mini filejev, in sicer v primeru uporabe olja kot nosilca. To pomeni, da je bil bistveno bolj pomemben predvsem vpliv nosilca, medtem ko ni bilo zaznani bistvenih razlik med običajnimi in *n*-3-obogatenimi mini fileji.

WOF je nekoliko bolj prišla do izraza pri mariniranih mini filejih, čeprav tudi v tem primeru ni bila močno izražena. Jakost WOF arome se je s časom skladiščenja praviloma nekoliko povečala. Najbolj izrazito poslabšanje je bilo zaznati v primeru kontrolne marinade brez dodanega ekstrakta, kar kaže na njegov pozitiven učinek. Pri tem velja, da način toplotne obdelave pomembno vpliva ($p < 0,001$ in $p < 0,01$) na pojav WOF arome, saj je bila pri vseh marinadah najbolj izražena pri pečenju v pečici, najmanj pa pri pečenju na žaru. To je povezano predvsem s časom in temperaturo toplotne obdelave, saj višja temperatura in krajši čas, kar dosežemo pri pečenju na žaru, upočasnita oksidacijske procese, saj se pri tem zniža aktivacijska energija za oksidacijo in tako je ovirana pretvorba hidroperoksida v proste radikale, ki stimulirajo oksidacijske procese (Bastida in sod., 2009). Izkazalo se je, da nosilec ekstrakta vpliva na WOF, medtem ko ni bilo zaznani bistvenih razlik med običajnimi in *n*-3-obogatenimi mini fileji.

Poslabšanje vonja in arome ter prisotnost žarkosti so bili najbolj zaznani v sekljancih, pakiranih v atmosfero z veliko O₂ (MAP-hO₂ in WP-ICO₂) najmanj pa v sekljancih, pakiranih v atmosfero z majhno koncentracijo O₂ (MAP-IO₂), ne glede na to, če so bile to običajni ali *n*-3-obogateni sekljanci. Velja poudariti, da je senzorični panel ugotovil večje poslabšanje senzoričnih lastnosti *n*-3 kot pa običajnih sekljancev, predvsem pri senzorični oceni žarkosti. Pri *n*-3-obogatenih sekljancih v atmosferi z veliko O₂ (MAP-hO₂) so preskuševalci žarkost ocenili z 2,4, kar je ekvivalent izrazu 'srednje (bolj) izražena' do 'močno izražena'. Rezultati v naši študiji, vezani na deskriptorje arome, še posebej za žarkost, so skladni z ugotovitvami Valencia in sod. (2006), ki so potrdili, da se splošna sprejemljivost poslabša s povečanjem vsebnosti *n*-3 VMNK v mesnih izdelkih. Nasprotno pa Betti in sod. (2009b) niso ugotovili značilnega vpliva dodatka lanenega semena v krmo piščancev na aromo *n*-3-obogatenih mesnih izdelkov, kar se je potrdilo tudi v našem primeru mariniranih mini filejev. V tem primeru je bil čas skladiščenja dokaj kratek, zato žarke arome praktično ni bilo možno zaznati v nobenem primeru, kljub temu da smo s predhodnimi kemijskimi analizami pokazali, da oksidacijski procesi že potekajo (povečan TBK, tvorba OH). Manjša odstopanja so se pojavila le v primeru uporabe olja kot nosilca.

5.1.4 Heterociklični aromatski amini

Nekatere raziskave so pokazale tudi povezavo med oksidacijo lipidov in tvorbo HAA, saj naj bi se produkti oksidacije na različne načine vključevali v Maillardovo reakcijo, preko katere se tvorijo HAA (Farmer in Mottram, 1990; Faulkner, 1994; Johansson, 1995). To so potrdili tudi Zamora in sod. (2013) z modelnim poskusom.

V našem poskusu smo tako spremljali tvorbo produktov oksidacije preko števila TBK in vsebnosti OH ter istočasno količino nastalih HAA. Iz dobljenih rezultatov domneve, da povečan obseg oksidacije lahko privede do povečane tvorbe HAA, ne moremo v celoti potrditi. V primeru mariniranih mini filejev se namreč na zadnji (deveti) dan skladiščenja tvori celo najmanj HAA, medtem ko sta število TBK in vsebnost OH takrat največja. Izjema v tem primeru je pečenje na žaru, kjer se količina HAA povečuje s časom skladiščenja, vendar tu predvidevamo, da prevladuje vpliv načina toplotne obdelave, bolj kot čas skladiščenja.

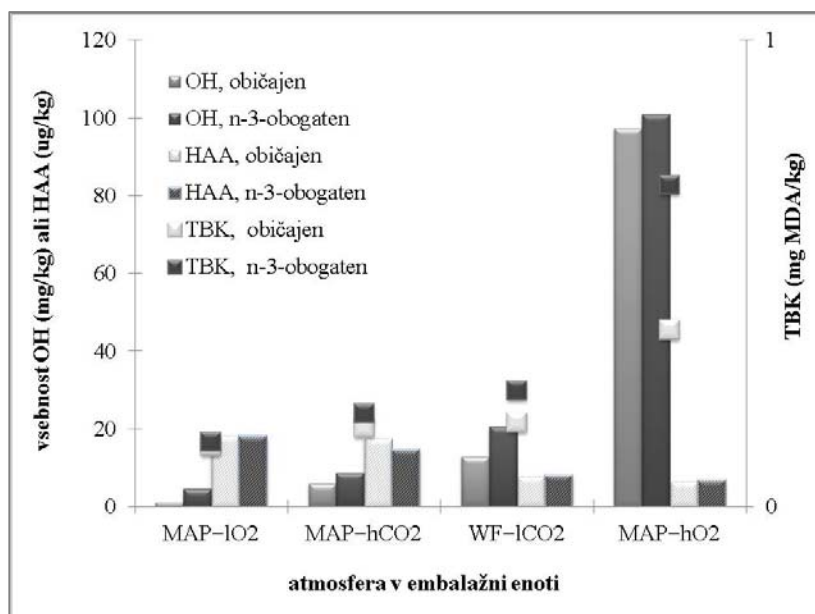
Pri komercialnih sekljancih smo prišli do podobnih ugotovitev, kjer tudi ne moremo potrditi pozitivne povezave med oksidacijskimi procesi in tvorbo HAA, saj je tudi v tem primeru prišlo do ravno nasprotnega učinka. Kot je razvidno iz slike 22 se je največja količina HAA tvorila pri sekljancih, ki so bili pakirani v atmosfero z najmanjšo koncentracijo O₂, najmanj pa pri tistih, ki so bili pakirani v atmosfero z največjo koncentracijo O₂, kar je ravno nasprotno s tvorbo oksidacijskih produktov.

Dejstvo, ki še dodatno ovrže morebitno povezanost med oksidacijskimi procesi in tvorbo HAA je tudi to, da *n*-3-obogatitev oz. povečan delež VNMK v našem primeru bistveno ne vpliva na povečano tvorbo HAA kot se je to pokazalo pri številu TBK in količini OH.

Izkazalo se je celo nasprotno, količina skupnih HAA je bila pri *n*-3-obogatenih vzorcih v večini primerov celo manjša kot pri običajnih. Ta pojav lahko razložimo z dejstvom, da ima *n*-3-obogateno meso, zaradi dodatka organskega selena v krmo teh živali, večjo sposobnost za vezanje vode, kar zmanjšuje možnost nastanka HAA. Druga možna razlaga za ta pojav je lahko tudi nekoliko večji delež skupnih maščob v *n*-3-obogatenih vzorcih, čeprav vpliv maščobe na tvorbo HAA ni še popolnoma pojasnjen in prihaja do nasprotujočih si rezultatov. Hwang in Ngadi (2002) razlagata, da večji delež maščobe pomeni manjši delež drugih komponent, med drugim tudi prekurzorjev HAA, kar zmanjšuje tvorbo HAA. Inhibitorni učinek maščob na tvorbo HAA pa lahko razložimo tudi z dejstvom, da je maščoba bolj učinkovit medij za prenos toplote, kar skrajša čas toplotne obdelave in posledično tudi manj HAA (Alaejos in Afonso, 2011). Na drugi strani pa se pojavljajo podatki, ki kažejo ravno nasprotno in to povezujejo predvsem s tvorbo prostih radikalov, ki vplivajo na potek Maillardove reakcije in s tem na povečano tvorbo HAA (Skog in sod., 1998). Poleg tega se je pokazalo, da je bil učinek dodanega ekstrakta na tvorbo HAA večji v primeru *n*-3-obogatenih vzorcev.

Skozi vse opravljene poskuse se je pokazalo, da sta zelo pomembna faktorja pri tvorbi HAA tudi način toplotne obdelave ter vrsta izbranega nosilca oz. dodatek ekstrakta. Podobno kot ugotavljajo številni avtorji (Shin, 2005; Gašperlin in sod., 2009; Liao in sod., 2010) se je tudi v našem primeru značilno največ HAA tvorilo pri pečenju na žaru v primerjavi s pečenjem v pečici in pečici IR. Pri pečenju na žaru je namreč površina mesa in s tem

prekursorji HAA v neposrednem stiku z grelno ploščo. V tem primeru se vsebnost vode na površini zmanjša, nasprotno pa se poveča koncentracija kreatina, glukoze in prostih AK in posledično se HAA skoncentrirajo na površini mesa (Jägerstad in sod., 1998). Potrdili smo tudi ugotovitve Oz in sod. (2010), da se količina HAA povečuje tudi s stopnjo pečenosti.

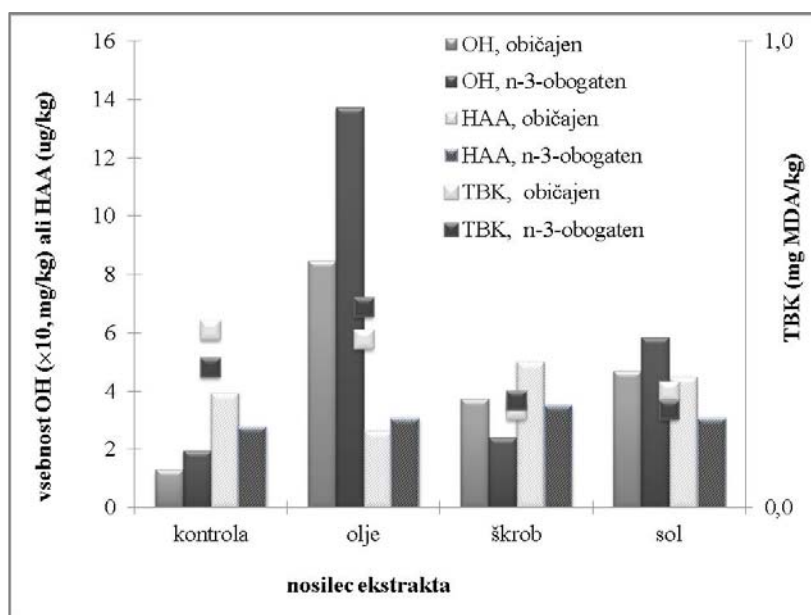


Slika 22: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n-3*-obogatitev) na vsebnost oksidov holesterola (OH), heterocikličnih aromatskih aminov (HAA) in TBK piščančjih sekljancev, skladiščenih 8 dni pri temperaturi (4 ± 1) °C, glede na atmosfero v embalažnih enotah (MAP-IO₂ – <1% O₂, MAP-hCO₂ – 20% O₂, WF-ICO₂ – 21% O₂ in MAP-hO₂ – 87% O₂)

Figure 22: Effect of diet (*n-3* enrichment) on content of cholesterol oxides (COPs) and heterocyclic amines (HAAs), and TBARS of chicken patties, stored 8 days at (4 ± 1) °C, with respect to package-atmosphere condition (MAP-IO₂ – <1% O₂, MAP-hCO₂ – 20% O₂, WF-ICO₂ – 21% O₂, and MAP-hO₂ – 87% O₂)

V sklopu II in III smo podrobno proučevali tudi vpliv izbranega nosilca ekstrakta ter ekstrakta in pri tem dobili nekoliko nasprotujoče si rezultate. Dejstvo je, da gre za dva popolnoma ločena in neodvisna poskusa, kjer so pogoji težko primerljivi, vendar kljub temu lahko potegnemo določene povezave med njimi.

Tako se je v primeru sekljancev pečenih na žaru (sklop II) izkazalo, da ima dodatek različnih ekstraktov v večini primerov pozitiven učinek na zmanjšano tvorbo HAA glede na kontrolo, in sicer pri obeh uporabljenih nosilcih ekstraktov (škrob, sol). Nasprotno pa tega ne moremo trditi v primeru mariniranih mini filejev, saj se je pri enakem postopku toplotne obdelave (žar), uporabi istega nosilca ter dodatku ekstrakta količina skupnih HAA glede na kontrolo celo povečala. Pri tem moramo upoštevati, da imamo dve popolnoma različni strukturi matriksa (sekljance in cel kos mesa), v katerih se očitno spremeni tudi funkcija posameznega nosilca.



Slika 23: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n-3*–obogatitev) in vrste nosilca ekstrakta brinovih jagod na vsebnost oksidov holesterola (OH), heterocikličnih aromatskih aminov (HAA) in TBK mariniranih piščančjih mini filejev, skladiščenih 9 dni pri temperaturi (4 ± 1) °C in pečenih na dvoploščnem žaru (T_s = 82 °C)

Figure 23: Effect of diet (*n-3* enrichment) and different plant extract carriers on content of cholesterol oxides (COPs) and heterocyclic amines (HAs), and TBARS of marinated chicken inner fillets, stored 9 days at (4 ± 1) °C and thermally treated on two-plated grill (T_i = 82 °C)

Zelo zanimivi so predvsem rezultati dobljeni v primeru uporabe škroba kot nosilca, saj v sklopu II, ko imamo sekljance, dobimo popolnoma nasprotno rezultate kot v sklopu III, kjer smo uporabili cele kose mesa. Najverjetnejši razlog za ta pojav je v tem, da v razdetem mesu (sekljanci) se škrob »vgradi« v razdeto strukturo mesa in ustvari nekakšno mrežo, ki uspešno zadržuje vodo v notranjosti. To posledično pomeni manjši prenos prekursorjev HAA na površino in zmanjšano tvorbo HAA. V tem primeru pride do izraza tudi učinek dodatnega ekstrakta, saj se vsebnost HAA glede na kontrolo povsod zmanjša. Popolnoma nasprotno pa se zgodi v primeru nerazdetega mesa (mini file), kar je verjetno posledica koncentriranja škroba na površini kosa mesa. To posledično pomeni povečano tvorbo HAA, saj škrob lahko opredelimo kot vir prekursorjev HAA. Ta pojav je posebej izrazit pri pečenju na žaru, kjer gre za neposreden stik površine z razgreto ploščo žara. V tem primeru se količina HAA ob dodatku ekstrakta brinovih jagod precej poveča glede na kontrolo (slika 23).

Izkazalo se je, da je učinek dodanega ekstrakta močno odvisen predvsem od kombinacije načina toplotne obdelave in nosilca ekstrakta, kar lahko potrdimo tako v primeru uporabe škroba kot tudi olja kot nosilca. Tako je učinek ekstrakta vezanega na škrob pri pečenju v pečici in pečici IR popolnoma nasproten od pečenja na žaru. Podobno velja v primeru uporabe olja kot nosilca, kjer se količina HAA pri pečenju v pečici in pečici IR poveča glede na kontrolo, nasprotno pa zmanjša pri pečenju na žaru. To lahko razložimo s tem, da olje omogoči hitrejši prenos toplote, kar je ključno pri pečenju na žaru, kjer imamo neposreden kontakt. To pomeni krajši čas toplotne obdelave ter boljši učinek ekstrakta.

5.2 SKLEPI

Na osnovi rezultatov raziskave lahko zaključimo:

- profili fenolnih spojin izbranih rastlinskih ekstraktov se razlikujejo;
- noben izmed uporabljenih etanolnih rastlinskih ekstraktov (1 % raztopina) ni pokazal citotoksične oz. genotoksične aktivnosti na testnem celičnem modelu humanega hepatoma (HepG2 celice);
- *n*-3–obogateno piščančje meso oz. sekljanci vsebujejo značilno večji delež večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) v primerjavi z običajnim mesom oz. sekljanci;
- število tiobarbiturne kisline (TBK) je pri *n*-3–obogatenih sekljancih povprečno do 68 % večje kot pri običajnih, nasprotno pri mini filejih vpliv *n*-3–obogatitve TBK ni značilen;
- dodatek ekstrakta brinovih jagod značilno zmanjša število TBK pri običajnem in *n*-3–obogatenem presnem piščančjem mesu, najbolj izrazito v primeru vezave ekstrakta na sol oz. škrob, pri olju deluje prooksidativno;
- toplotna obdelava povzroči povečanje števila TBK (pečenje na žaru<pečica≡IR);
- majhne koncentracije O₂ v embalažnih enotah pričakovano preprečujejo povečanje števila TBK, najbolj učinkovito pri *n*-3–obogatenih komercialnih sekljancih in uporabi olja kot nosilca rastlinskega ekstrakta v primeru mariniranih mini filejev;
- *n*-3–obogatitev piščančjega mesa v primerjavi z običajnim mesom bistveno poveča tvorbo oksidov holesterola (OH);
- na splošno dodatek ekstrakta brinovih jagod, vezan na različne nosilce, po petdnevnem skladiščenju zmanjša, po devetdnevem pa poveča tvorbo OH; uporabljeni nosilci pri različnih pogojih različno prispevajo k nastanku OH (škrob<sol<olje);
- na presnih mini filejih in toplotno obdelanih komercialnih sekljancih, pakiranih v atmosfero s relativno veliko koncentracijo O₂ (20 vs. 80%) se je oblikovalo bistveno več OH kot v vzorcih, pakiranih v atmosfero z majhno koncentracijo O₂ (< 0,1 %);
- dodatek ekstrakta brinovih jagod vezanega na olje povzroči pojav tujih arom po toplotni obdelavi mini filejev, hkrati pa prepreči nastanek arome po pogretem;
- pri komercialnih sekljancih smo ugotovili pozitivno povezavo med številom TBK in OH ($r = 0,68^{***}$);
- z vidika zaviranja oksidacijskih procesov sklepamo, da je kot nosilec ekstrakta najbolj primeren škrob, pakiranje v atmosfero z majhnimi koncentracijami O₂, ter med postopki toplotne obdelave pečenje na žaru;
- *n*-3–obogatitev piščančjega mesa v primerjavi z običajnim mesom zmanjša nastanek heterocikličnih aromatskih aminov (HAA) po toplotni obdelavi, vendar razlike niso statistično značilne;
- način toplotne obdelave in stopnja pečenosti vplivata na tvorbo HAA; značilno največ HAA se tvori pri pečenju na žaru in stopnji pečenosti do središčne temperature 95 °C;
- na splošno večina dodatkov rastlinskih ekstraktov v meso zmanjša tvorbo HAA po toplotni obdelavi, pri tem je zelo pomemben vpliv matriksa (integralni kos mesa vs. razdeto meso), načina toplotne obdelave (žar, pečica, pečica IR) ter nosilca ekstrakta (sol, olje, škrob)
- po toplotni obdelavi komercialnih sekljancev, pakiranih v atmosfero s koncentracijo O₂ okoli 80 %, se je oblikovalo 2,8-krat manj HAA kot pri sekljancih, pakiranih v atmosfero z najmanjšo koncentracijo O₂ (< 0,1 %);

- z vidika zaviranja nastanka HAA sklepamo, da je kot nosilec ekstrakta najbolj primeren škrob, pakiranje v atmosfero z velikimi koncentracijami O₂, ter med postopki toplotne obdelave pa pečenje v pečici in pečici IR.

6 POVZETEK

Dejstvo je, da se je v zadnjem obdobju v skrbi za bolj zdravo življenje med potrošniki zelo povečalo zanimanje za uživanje živil bogatih z *n*-3 VNMK, saj je bilo že večkrat dokazano, da imajo le-te pozitivne učinke na človeški organizem. Na drugi strani pa imajo to slabost, da so zelo podvržene oksidacijskim procesom in v skladu s predhodnimi raziskavami smo pričakovali povečano stopnjo oksidacije pri *n*-3-obogatenem mesu. Hidroperoksidi in ostali prosti radikali, ki se generirajo med oksidacijo VMNK naj bi bili ob tem odgovorni tudi za iniciacijo oksidacije holesterola in s tem tvorbo oksidov holesterola (OH), ki dokazano z *in vitro* in *in vivo* poskusi delujejo citotoksično, mutageno in celo karcionogeno, ter jih tako povezujejo z razvojem sodobnih civilizacijskih bolezni, kot so ateroskleroza in razna rakava obolenja (Souza in Silva, 2006; Hur in sod., 2007). Nekatere raziskave so pokazale celo povezavo med oksidacijo lipidov in tvorbo mutagenih in karcinogenih heterocikličnih aromatskih aminov (HAA). Lipidi in njihovi produkti oksidacije se namreč na različne načine lahko vključujejo v Maillardovo reakcijo (Farmer in Mottram, 1990) in na tak način z interakcijami vplivajo na tvorbo HAA v mesnih proizvodih (Faulkner, 1994; Johansson, 1995). Znano je, da sam proces oksidacije lipidov, poleg tvorbe zdravju škodljivih produktov, povzroči tudi negativne spremembe senzoričnih lastnosti, predvsem barve in arome, ki ključno vplivata na potrošnikovo odločitev za nakup proizvoda.

Zato smo za cilj naše študije izbrali vrednotenje vpliva dodatka rastlinskih ekstraktov v kompleksne matrikse, kot je meso oz. sekljanine, na zmanjšanje tvorbe omenjenih zdravju škodljivih komponent, ki nastanejo med skladiščenjem svežega mesa v različnih aerobnih pogojih (produkti oksidacije lipidov) in med različnimi postopki toplotne obdelave in stopnjami pečenosti mesa (HAA). Znano je, da imajo rastlinski ekstrakti antioksidativne lastnosti, ki se zmanjšajo ob uporabi neustreznega nosilca. Dodaten poudarek študije je tudi vrednotenje vpliva obogatitve piščančjega mesa z *n*-3 VNMK na vse opazovane fizikalno-kemijske in senzorične parametre.

Eksperimentalni del je potekal v več sklopih, v okviru katerih smo opravili ekstrakcijo in karakterizacijo rastlinskih ekstraktov, določili maščobnokislinsko sestavo piščančjega mesa in njegovo oksidativno stabilnost (število TBK) ter vsebnost nastalih OH in HAA v pripravljenih piščančjih sekljancih in mariniranem piščančjem mesu pri določenih pogojih skladiščenja in toplotne obdelave.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v rastlinskih ekstraktih smo določili z metodo Folin-Ciocalteu, posamezne fenolne spojine pa z LC-MS/MS. Citotoksičnost in genotoksičnost etanolnih rastlinskih ekstraktov smo določili s testi MTT, MTS in komet. Osnovno kemijsko sestavo (vsebnost vode, beljakovin, skupnih mineralnih snovi in maščob) smo izmerili z aparatom FoodScanTM Meat Analyser, ki deluje na principu NIR spektrometrije. Maščobnokislinsko sestavo piščančjega fileja in komercialnih sekljancev smo določili z metodo, modificirano po Parku in Goinsu (1994) ter objavljeno v Polak in sod. (2008). HAA smo analizirali z ekstrakcijo s trdno fazo (SPE) ter tekočinsko kromatografijo in masno spektrometrijo (LC-MS) po metodi Polak in sod. (2009). Za določanje števila TBK smo uporabili modificirano ekstrakcijsko metodo, ki so jo opisali Witte in sod. (1970). Za določanje vsebnosti OH v vzorcih smo uporabili metodo po Penko in sod. (2015), sestavljeno iz hladne saponifikacije, ekstrakcije, postopka SPE in določanja OH s tekočinsko kromatografijo s tandemskim masnim spektrometrom (LC-MS/MS). Meritve

sestave atmosfere v embalažnih enotah smo opravili z napravo OXYBABY® V (WITT Gasetechnik GmbH & Co. KG, Avstrija). Barvo površine vzorcev smo določili instrumentalno s kromametrom Minolta CR 400 (Minolta, Japonska) in sistemom, ki barvo podaja v treh koordinatah (L^* , a^* in b^*). Senzorično vrednotenje smo opravili s testom točkovanja lastnosti iz skupine deskriptivnih analiz z strukturirano točkovno lestvico (Golob in sod., 2005). Rezultate analiz smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS.

Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da se profili fenolnih spojin izbranih rastlinskih ekstraktov razlikujejo in da noben izmed uporabljenih etanolnih rastlinskih ekstraktov ne izkazuje citotoksičnosti oz. genotoksičnosti na testnem celičnem modelu humanega hepatoma (HepG2 celice). Potrdili smo hipotezo, da *n*-3-obogateno piščančje meso oz. sekljanci vsebuje značilno večji delež VNМК v primerjavi z običajnim mesom oz. sekljanci. *n*-3-obogatitev je povzročila povečano tvorbo malondialdehida (povečanje števila TBK) in OH, in praviloma zmanjšanje nastalih HAA (neznačilno) po toplotni obdelavi v primerjavi z običajnim mesom. Večina dodatkov rastlinskih ekstraktov v meso zmanjša tvorbo HAA po toplotni obdelavi, pri čemer je potrebno upoštevati vpliv matriksa (integralni kos meso vs. razdeto meso), načina toplotne obdelave (žar, pečica in pečica IR) ter nosilca ekstrakta (sol, olje in škrob). Z vidika zaviranja oksidacijskih procesov smo ugotovili, da je kot nosilec ekstrakta najbolj primeren škrob, pakiranje v atmosfero z majhnimi koncentracijami O₂, ter med postopki toplotne obdelave pečenje na žaru. Dodatek ekstrakta brinovih jagod značilno zmanjša število TBK in OH po devetdnevem skladiščenju, z izjemo olja kot nosilca ekstrakta. Način toplotne obdelave in stopnja pečenosti pa različno vplivata na število TBK in tvorbo HAA; značilno najmanj malondialdehida (manjše število TBK) in nasprotno največ HAA se tvori pri pečenju na žaru, pri pečenju v pečici in pečici IR pa približno enako. Skladiščenje piščančjega mesa in sekljancev v izrazito aerobnih pogojih (O₂, med 20 % in 80 %) poveča število TBK in vsebnost skupnih OH ter bistveno zmanjša vsebnost HAA po toplotni obdelavi v primerjavi z majhno koncentracijo O₂ (< 0,1 %). Hkrati pa se v takih pogojih poslabšajo senzorični parametri, ki kažejo na oksidacijske procese (pojav žarke in postane arome).

6.1 SUMMARY

Modern consumers require nutritional food with functional properties. One of these possibilities is the inclusion of meat enriched with *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the human diet. It is well known that *n*-3 PUFA consumption have positive effects on human body. However, oxidation is a major cause of deterioration of *n*-3-enriched meat, this is reason why we expect an increased degree of oxidation. During the oxidation of PUFAs some hydroperoxide and other free radicals are generated, which are responsible for the initiation steps of the cholesterol oxidation and formation of cholesterol oxides (COPs). These COPs are known to have a wide range of adverse biological effects, which include cytotoxicity, mutagenesis, carcinogenesis, and especially atherogenesis (Souza and Silva, 2006; Hur et al., 2007). Some studies have been shown a link between lipid oxidation and the formation of mutagenic and carcinogenic heterocyclic aromatic amines (HAA). Lipids and their oxidation products may be in different ways involved in Maillard reaction (Farmer and Mottram, 1990), namely in this way they affect the formation of HAA in meat products (Faulkner, 1994; Johansson, 1995). It is known that the lipid oxidation arises the negative effect on sensory attributes (especially the colour and flavor) and the nutritional value, and it might also result in the production of toxic compounds, all that have crucial impact on the consumer's decision to purchase the product.

Therefore, aim of this study was to examine the effect of the plant extracts addition in complex matrixes (meat/patties, conventional or *n*-3-enriched) to reduce the formation of harmful components that occur during storage of fresh meat in various aerobic conditions (products oxidation of lipids: thiobarbituric acid-reactive substances, TBARs, and cholesterol oxides, COPs) and different types of thermal treatment/doneness of meat (heterocyclic aromatic amines, HAA). The effect of plant extract addition may be reduced if they are not bounded to an appropriate carrier. Another focus of the study is also evaluation of *n*-3-enrichment of chicken meat on all observed physicochemical and sensory parameters. None of the studies conducted so far have observed the impact of *n*-3-enrichment on HAA formation, which is a significant contribution to the development of science.

The experiment was carried out in several sections, within which we have performed the extraction and characterization of plant extracts, determined the fatty acid composition of chicken meat and its oxidative stability (TBARs), as well as the content of COPs and HAA in the prepared chicken patties and marinated chicken meat under certain conditions of storage and heat treatment.

The content of total phenolic compounds of the selected plant extracts were determined by the method of Folin-Ciocalteu method and individual phenolic compounds by LC-MS/MS, cytotoxicity and genotoxicity of them were checked by MTT, MTS and Comet test. The basic chemical composition of chicken meat and commercial patties (content of water, protein and fat) were measured by near-infrared (NIR) spectroscopy (FoodScan™ Meat Analyser). The FA composition of the samples was determined by gas chromatography (GC). The method used was *in situ* transesterification (Park and Goins, 1994), as modified by Polak *et al.* (2008). HAA was analysed by solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS) according to the method of Polak *et al.* (2009). The TBARs were determined using a modified extraction method described by

Witte et al. (1970). For the determination of individual and total content of COPs was used method of Penko *et al.* (2015), consisting of cold saponification, extraction, the process of the SPE and COPs determination by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). A mobile gas analyser for the testing of modified atmospheres in food packages (OxyBaby_V; Witt-Gasetechnik GmbH & Co.KG, Austria) was used to determine the gas compositions in the packages under each of the package-atmosphere conditions, as % O₂ and % CO₂. A CR 200b colorimeter (Minolta; Illuminant C, 0 viewing angle) was used to determine the Commission Internationale de l'Eclairage (CIE; International Commission on Illumination) L^* (lightness), a^* (red to green) and b^* (yellow to blue) values on the surface of the raw chicken meat or patties. On the basis of a preliminary tasting, for the purpose of the evaluation, the panel decided in favour of one and applied the analytical descriptive test (Golob *et al.*, 2005). The analysis was performed by scoring the sensory attributes according to a scale from 0 to 4 or 0 to 7, respectively. The results of the analysis were statistically analysed by a statistical program SAS.

Based on the results we can conclude that the selected plant extracts discriminate according to their phenolic profile and that none of the ethanolic plant extracts does not show cytotoxicity or genotoxicity in tumor cells HepG2. We have confirmed the hypothesis that *n*-3-enriched chicken meat or patties contain significantly higher proportion of PUFA compared to conventionally produced meat or patties. *n*-3-enrichment has resulted in increased formation of TBARs and COPs, and decreased formation of HAA (insignificant) after heat treatment compared to conventionally produced meat. Also the addition of the majority of plant extracts in the meat significantly reduce the HAA formation after the heat treatment, depending on matrix (an integral piece of meat *vs.* minced meat), type of heat treatment (grill, oven, and infrared oven), and carriers of the extract. With regard to inhibition of oxidation processes, we found that the most suitable carrier for the extracts is starch, packing in an atmosphere with low concentrations of O₂, and grilling as thermal treatment. The addition of juniper berries extract significantly reduces TBARs and COPs content after 9 days of storing, with the exception of oil-carrier of the extract. TBARs and content of formed HAA depends on type of heat treatment and degree of doneness; generally, the highest content of HAA and *vice versa* the lowest TBARs are formed during grilling, values formed during baking in the oven and IR oven are approximately the same. Storage chicken meat and patties in oxygen rich conditions (O₂, between 20% and 80%) increase the TBARs and content of total OH as well as significantly reduces content of HAA after heat treatment compared with storage at low O₂ concentration (< 0.1%). At the same time, in such conditions sensory parameters are deteriorated and indicate that the lipid oxidation are in progress (occurrence of rancidity and warm-off flavours).

7 VIRI

- Ahn J., Grün I. U. 2006. Heterocyclic amines: 2. Inhibitory effects of natural extracts on the formation of polar and nonpolar heterocyclic amines in cooked beef. *Journal of Food Science*, 70: 263-268
- Ahn J., Grün I. U., Mustapha A. 2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, 24: 7-14
- Alaejos M. S., Pino V., Alfonso A. M. 2008. Metabolism and toxicology of heterocyclic aromatic amines when consumed in diet: Influence of the genetic susceptibility to develop human cancer. A review. *Food Research International*, 4, 327-340
- Alaejos M.S., Alfonso A.M. 2011. Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 52-108
- Almela L., Sánchez-Munoz B., Fernández-López J.A., Roca M.J., Rabe V. 2006. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolic and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120: 221-229
- Arnold D.R., Kwiterovich P.O. 2003. Cholesterol – absorption, function and metabolism. V: *Encyclopedia of food science and nutrition*. Vol. 2. 2nd ed. Calabero B., Trugo C.L., Finglas M.P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1226-1236
- Arvidsson P., Boekel M.A.J.S., Skog K., Jägerstad M. 1997. Kinetics of formation of polar heterocyclic amines in a meat model system. *Journal of Food Science*, 62, 5: 911-916
- Aytul K.K. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of olive leaf extract and its food applications. Master of Science in Biotechnology. Izmir Graduate School of Engineering and Science: 1-28
- Azcona J.O., Garcia P.T., Cossu M.E., Iglesias B.F., Picallo A., Perez C., Gallinger C.I., Schang M.J., Canet Z.E. 2008. Meat quality of Argentinian “Camperos” chicken enhanced in omega-3 and omega-9 fatty acids. *Meat Science*, 79: 437–443
- Baggio S.R., Rauen Miguel A.M., Bragagnolo N. 2005. Simultaneous determination of cholesterol oxides, cholesterol and fatty acids in processed turkey meat products. *Food Chemistry*, 89: 475-484
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203
- Balogh Z., Gray J.I., Gomma E.A., Booren A.M. 2000. Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 395-401
- Bastida S., Sánchez-Muniz F.J., Olivero R., Pérez-Olleros L., Ruiz-Roso B., Jiménez-Colmenero F. 2009. Antioxidant activity of Corb fruit extracts in cooked pork meat system during chilled and frozen storage. *Food Chemistry*, 116: 748-754
- Belcher J.N. 2006. Industrial packaging developments for the global meat market. *Meat Science*, 74: 143–148

- Betti M., Perez T.I., Zuidhof M.J., Renema R.A. 2009b. Omega-3 enriched broiler meat: 3. Fatty acid distribution between triacylglycerol and phospholipid classes. *Poultry Science*, 88, 1740–1754
- Betti M., Schneider B.L., Wismer W.V., Carney V.L., Zuidhof M.J., Renema R.A. 2009a. Omega-3-enriched broiler meat: 2. Functional properties, oxidative stability, and consumer acceptance. *Poultry Science*, 88: 1085–1095
- Bonoli M., Caboni M.F., Rodriguez-Estrada M.T., Lercker G. 2008. Effect of processing technology on the quality and composition of lipids of precooked chicken patties. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 296–308
- Bordas M., Monyano E., Puignou L., Galceran M.T. 2004. Formation and stability of heterocyclic amines in meat flavour model system. Effect of temperature, time and precursors. *Journal of Chromatography B*, 802: 11-17
- Boselli E., Caboni M.F., Rodriguez-Estrada M.T., Toschi T.G., Daniel M., Lercker G. 2005. Photooxidation of cholesterol and lipids of turkey meat during storage under commercial retail conditions. *Food Chemistry*, 91, 4: 705–713
- Boselli E., Valazco V., Caboni M. F., Ledcker G. 2001. Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in eggs-containing food. *Journal of Chromatography A*, 917: 239-244
- Braga M. E. M., Santos R. M. S., Seabra I.J., Facanali R., Marques M. O.M., de Sousa H. C. 2008. Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark. *Journal of Supercritical Fluids*, 47: 37-48
- Brannan R. G., Mah E. 2007. Grape seed extract inhibits lipid oxidation in muscle from different species during refrigerated and frozen storage and oxidation catalyzed by peroxynitrite and iron/ascorbate in a pyrogallol red model system. *Meat Science*, 77: 540-546
- Brannan R.G. 2009. Effect of grape seed extract on descriptive sensory analysis of ground chicken during refrigerated storage. *Meat Science*, 81: 589-595
- Bressac B., Galvin K.M., Liang T.J., Isselbacher K.J., Wands J.R., Ozturk M. 1990. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular-carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 5: 1973-1977
- Busquets R., Puignou L., Galceran M.T., Skog K. 2006. Effect of cherry tissue on lipid oxidation and heterocyclic aromatic amine formation in ground beef patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4891-4897
- Cayuela J.M., Gil M.D., Bañón S., Garrido M.D. 2004. Effect of vacuum and modified atmosphere packaging on the quality of pork loin. *European Food Research and Technology*, 219: 316–320
- Chae H.S., Singh N.K., Yoo Y.M., Ahn C.N., Ham J.S., Kim D.H. 2007. Meat quality and storage characteristics depending on PSE status of broiler breast meat. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20: 582–587
- Chaijan M. 2008. Review: Lipid and myoglobin oxidations in muscle foods. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30, 1: 47-53

- Cheng K., Chen F., Wang M. 2006. Heterocyclic amines: Chemistry and health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50: 1150-1170
- Cheng K. W., Wu Q., Zheng Z. P., Peng X., Simon J. E., Chen F., Wang, M. 2007. Inhibitory effect of fruit extracts on the formation on heterocyclic amines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 25: 10359-10365
- Collins A.R., Dobson V.L., Dušinská M., Kennedy G., Štětina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 375, 2: 183-193
- Conchillo A., Ansorena D., Astiasarán I. 2003. Combined effect of cooking (grilling and roasting) and chilling storage (with or without air) on lipid and cholesterol oxidation in chicken breast. *Journal of Food Protection*, 66: 840–846
- Conchillo A., Ansorena D., Astiasarán I. 2005. Use of microwave in chicken breast and application of different storage conditions: consequences on oxidation. *European Food Research and Technology*, 221: 592-596
- Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 564-582
- Damašius J., Venskutonis P.R., Ferracane R., Fogliano V. 2011. Assessment of influence of some spice extracts on the formation of heterocyclic amines in meat. *Food Chemistry*, 126: 149-156
- D'Andrea G. 2010. Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 81: 724-736
- Daun H., Solberg M., Franke W., Gilbert S. 1971. Effect of oxygen-enriched atmospheres on storage quality of packaged fresh meat. *Journal of Food Science*, 36: 1011–1014
- Dizer H., Wittekindt E., Fischer B., Hansen P.D. 2002. The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, *umu*-assay and selected biomarkers. *Chemosphere*, 46: 225-233
- Djenane D., Sánchez-Escalante A., Beltrán J.A, Roncalés P. 2002. Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary in combination with vitamin C, increase the oxidative stability of beef steak packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 76: 407-415
- Echarte M., Ansorena D., Astiasaran I. 2003. Consequences of microwave heating and frying on the lipid fraction of chicken and beef patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 20: 5941-5945
- El-Hamied A.A.Abd., Nassar A.G., El-Badry N. 2009. Investigation on antioxidant and antibacterial activities of some natural extracts. *World Journal of Dairy and Food Science*, 4, 1: 1-7
- Enser M., Scollan N., Gulati S., Richardson I., Nute G., Wood J. 2001. The effects of ruminally protected dietary lipid on the lipid composition and quality of beef muscle. V: Proceedings of the 47th International Congress of Meat Science and Technology 1, Kraków, august 26th - 31st 2001. Warszawa, Meat and Fat Research Institute: 186–187
- Erickson M.C. 2008. Lipid oxidation of muscle food. V: Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology. 3rd ed. Akoh C.C., Min D.B. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 322-326

- Farmer L. J., Mottram D. S. 1990. Interaction of lipid in the Maillard reaction between cysteine and ribose: effect of a triglyceride and three phospholipids on the volatile products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53: 505-525
- Faulkner J. 1994. Mechanism of heterocyclic amines formation in fried ground beef – the role of oxidized lipid and the Maillard reaction. PhD dissertation. Michigan State University. Department of Food Science and Human Nutrition: 5-20
- Faustman C., Sun Q., Mancini R., Suman S. P. 2010. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, 86: 86-94
- Felton J.S., Fultz E., Dolbear F.A., Knize M.G. 1994. Reduction of heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties by microwave pretreatment. *Food and Chemical Toxicology*, 32: 897-903
- Felton J.S., Jägerstad M., Knize M.G., Skog K. 2000. Contents in food, beverages and tobacco. V: *Food borne carcinogens: Heterocyclic amines*. Nagao M., Sugimura T. (eds.) New York, John Wiley&Sons, LTD: 31-72
- Fenech M. 2006. Commentary on the SFTG international collaborative study on the *in vitro* micronucleus test: To Cyt-B or not to Cyt-B? *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 607, 1: 9-12
- Feroli F., Caboni M.F., Dutta P.C. 2008. Evaluation of cholesterol and lipid oxidation in raw and cooked minced beef stored under oxygen-enriched atmosphere. *Meat Science*, 80: 681–685
- Ferk F. Huber W.W., Filipič M., Bichler J., Haslinger E., Mišič M., Nersesyan A., Grasl-Kraupp B., Žegura B., Knasmüller S. 2010. Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Mutation Research*, 691: 17-22
- Fernández-López J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Pérez-Alvarez J.A., Kuri V. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69: 371-380
- Filipič M. 2004. Genotoksične snovi v vodovodni in embalirani vodi: ali se jim lahko popolnoma izognemo. V: *Kakovost vodovodne in embalirane pitne vode. Pitne vode 2004, strokovno posvetovanje*. Ljubljana, 24.-26.11.2004. Komac M. (ur). Ljubljana, Zavod za tehnično izobraževanje: 93-101
- Gašperlin L., Lukan B., Žlender B, Polak T. 2009. Effects of skin and grilling method on formation of heterocyclic amines in chicken *pectoralis superficialis* muscle. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 1313-1319
- Ghiretti G.P., Zanardi E., Novelli E., Campanini G., Dazzi G., Madarena G., Chizzolini R. 1997. Comparative evaluation of some antioxidants in salame Milano and mortadella production. *Meat Science*, 47: 167–176
- Gibis M., Weiss J. 2010. Inhibitory effect of marinades with hibiscus extracts on formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of fried beef patties. *Meat Science* 85: 735-742

- Gibis M., Weiss J. 2012. Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on formation of heterocyclic amines in fried beef patties. *Food Chemistry*, 134: 766-774
- Gill C.O. 1988. The solubility of carbon dioxide in meat. *Meat Science*, 22: 65–71
- Golob T., Jamnik M., Bertoneclj J., Kropf U. 2005. Sensory analysis: methods and assessors. *Acta Agriculturae Slovenica*, 85: 55-66
- Golob T., Stibilj V., Žlender B., Doberšek U., Jamnik M., Polak T., Salobir J., Čandek-Potokar M. 2006. Slovenske prehranske tabele – meso in mesni izdelki. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 159–163
- Gray J.I., Goma E.A., Buckley D.J. 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43: 111-123
- Guardiola F., Codony R., Addis P.B., Rafecas M., Boatella J. 1996. Biological effects of oxysterols: current status. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 2: 193–211
- Han H., Baik B.K. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 1971-1978
- Hayes J.E., Allen P., Brunton N., O’Grady M.N., Kerry J.P. 2011. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126: 948-955
- Hayes J.E., Stepanyan V., Allen P., O’Grady M.N., Kerry J.P. 2010. Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. *Meat Science*, 84: 613-620
- Honikel K.O. 2009. Oxidative changes and their control in meat and meat products. V: Safety of meat and processed meat. Toldrá F. (ed.). New York, Springer: 313-340
- Horváthová E., Slameňová D., Hlinčíková L., Mandal T.K., Gábelová A., Collins A. R. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research/DNA Repair*, 409, 3: 163-171
- Huang S.S., Zheng R.L. 2006. Rosamarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action *in vitro*. *Cancer Letters*, 239: 271-280
- Hur S.J., Park G.B., Joo S.T. 2006. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. *Food Control*, 18: 939-947
- Hwang D.K., Ngadi M. 2002. Kinetics og heterocyclic amines formation in meat emulsion at different fat content. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 35, 7: 600-606
- Jägerstad M., Skog K., Arvidsson P, Solyakov A. 1998. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model system and cooked foods. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung = Food Ressearch and Technology*, 207, 6: 419-427

- Janoszka P. 2010a. Heterocyclic amines and azaarenes in pan-fried meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic. *Food Chemistry*, 120: 463-473
- Janoszka P. 2010b. 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol in pork meat and its gravy thermally treated without additives and in the presence of onion and garlic. *Meat Science*, 86: 976-984
- Jiménez S.M., Salsi M.S., Tiburzi M.C., Rafaghelli R.C., Tessi M.A., Coutaz V.R. 1997. Spoilage microflora in fresh chicken breast stored at 4 °C: influence of packaging methods. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 613-618
- Jiménez-Colmenero F., Carballo J., Cofrades S. 2001. Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, 59: 5-13
- Jinap S., Mohd-Mokhtar M.S., Farhadian A., Hasnol N.D., Jaafar S.N., Hajeb P. 2013. Effects of varying degrees of doneness on formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and beef satay. *Meat Science*, 94, 2: 202-207
- Johansson M. 1995. Influence of lipids, and pro- and antioxidants on the yield of carcinogenic heterocyclic amines in cooked foods and model systems. Doctoral dissertation. Lund, Lund Institut of Technology, Department of Applied Nutrition and Food Chemistry: 1-30
- Johansson M.A.E., Fredholm L., Bjerne I., Jägerstad M. 1995. Influence of frying fat on formation of heterocyclic amines in fried beefburgers and pan residues. *Food and Chemical Toxicology*, 33: 993-1004
- Johansson M.A.E., Jagerstad M. 1994. Occurrence of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in meat and fish products, including pan residues, prepared under domestic conditions. *Carcinogenesis*, 15, 8: 1511-1518
- Kakovič D. 2013. Pakiranje perutninskih pleskavic s povečano vsebnostjo n-3 maščobnih kislin Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 68 str.
- Kähkönen M. P., Hopia A. I., Vuorela H.J., Rauha J.-P., Pihlaja K., Kujala T. S., Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 3954-3962
- Keokamnerd T., Acton J.C., Han I.Y., Dawson P.L. 2008. Effect of commercial rosemary oleoresin preparations on ground chicken thigh meat quality packaged in a high-oxygen atmosphere. *Poultry Science*, 87: 170–179
- Kikugawa K. 1999. Involvement of free radicals in formation of heterocyclic amines and prevention by antioxidants. *Cancer Letters*, 143: 123-126
- Kim J. S., Suh M. H., Yang C. B., Lee H. G. 2003. Effect of γ -oryzanol on the flavor and oxidative stability of refrigerated cooked beef. *Journal of Food Science*, 68: 2423-2429
- Kim Y.H., Nam K.C., Ahn D.U. 2002. Volatile profiles, lipid oxidation and sensory characteristics of irradiated meat from different animal species. *Meat Science*, 61: 257-65
- Kizil M., Oz F., Besler H.T. 2011. A review on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic aromatic amines. *Journal of Food Processing and Technology*, 2, 5: 1-5

- Kizilirmak Esmer O., Irkin R., Degirmencioglu N., Degirmencioglu A. 2011. The effects of modified atmosphere gas composition on microbial criteria, color and oxidation values of minced beef meat. *Meat Science*, 88: 221–226
- Knasmüller S., Helma C., Eckl P.M., Gottman E., Steinkeller H., Kaisse F., Haider T., Parzefall W., Schulte-Herman R. 1998a. Investigation on genotoxic effects of ground water from Mitterndorfer Senke and from vicinity of Wiener Neustadt. *Weiner Klinische Wochenschrift*, 110, 23: 824-833
- Knasmüller S., Mersch-Sundermann V., Kevekordes S., Darroudi F., Huber W.W., Hoelzl C., Bichler J., Majer B.J. 2004. Use of human-derived liver cell for lines the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, 198: 315-328
- Knasmüller S., Parzefall W., Sanyal R., Ecker S., Schwab C., Uhl M., Mersh-Sundermann V., Williamson G., Heitsch T., Darroudi F., T. Natarajan A. 1998b. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research*, 402: 185-202
- Knize M.G., Dolbear F.A., Carroll K.L., Moore D.H., Felton J.S. 1994. Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 7: 595-603
- Knize M.G., Felton J.S. 2005. Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic aromatic amines formed from natural precursors in meat. *Nutrition Reviews*, 63: 158-165
- Ladikos D., Lougovois V. 1990. Lipid oxidation in muscle foods: A Review. *Food Chemistry*, 35: 295-314
- Lan C.M., Kao T.H., Chen B.H. 2004. Effects of heating time and antioxidants on the formation of heterocyclic amines in marinated foods. *Journal of Chromatography B*, 8021: 27-37
- Le Marchand L., Hankin J.H., Pierce L.M., Sinha R., Nerurkar P.V., Franke A.A., Wilkens L.R., Kolonel L.N., Donlon T., Seifried A., Custer L.J., Lum-Jones A., Chang W. 2002. Well-done red meat, metabolic phenotypes and colorectal cancer in Hawaii. *Mutation Research*, 506-507: 205-214
- Lee H.W., Chien J.T., Chen B.H. 2008. Inhibition of cholesterol oxidation in marinated foods as affected by antioxidants during heating. *Food Chemistry*, 108: 234-244
- Lercker G., Rodriguez-Estrada M.T. 2002. Cholesterol oxidation mechanisms. V: Cholesterol and phytosterol oxidation products: Analysis, occurrence, and biological effects. Gardiola F., Dutta P.C., Codony R., Savage G.P. (eds.). Champaign, AOCS Press: 1-25
- Leskanich C.O., Noble R.C. 1997. Manipulation of the ω -3 polyunsaturated fatty acid composition of avian eggs and meat. *World's Poultry Science Journal*, 53: 155–183
- Liao G.Z., Wang G.Y., Xu X.L., Zhou G.H. 2010. Effect of cooking methods on formation of heterocyclic amines in chicken and duck breast. *Meat Science*, 85: 149-154
- Loizzo M.R., Tunidis R., Conforti F., Saab A.M., Stastti G.A., Menichini F. 2007. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of

- Juniperus oxycedrus* spp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. Food Chemistry, 105: 572-578
- Lopez-Ferrer S., Baucells M.D., Barroeta A.C., Galobart J., Grashorn M.A. 2001. *n*-3 enrichment of chicken meat. 2. Use of precursors of long-chain polyunsaturated fatty acids: Linseed oil. Poultry Science, 80: 77–85
- Luciano G., Pauselli M., Servili M., Mourvaki E., Serra A., Monahan F.J., Lanza M., Priolo A., Zinnai A., Mele M. 2013. Dietary olive cake reduces the oxidation of lipids, including cholesterol, in lamb meat enriched in polyunsaturated fatty acids. Meat Science, 93: 703–714
- Luño M., Beltrán J.A., Roncalés P. 1998. Shelf-life extension and colour stabilisation of beef packaged in a low O₂ atmosphere containing CO. Meat Science, 48: 75–84
- Lynch M.P., Faustman C. 2000. Effect of aldehyde lipid oxidation products on myoglobin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 3: 600-604
- Maraschiello C., Esteve E., García Regueiro J.A. 1998. Cholesterol oxidation in meat from chickens fed α -tocopherol-and β -carotene-supplemented diets with different unsaturation grades. Lipids, 33: 705–713
- Maron D.M., Ames B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research, 49: 173-215
- MassLynx™ Version 4.1 SP4. 2004. Micromass® Ltd. UK Limited (Reg. U.S. Pat. & TM. Off.). Global mass – informatics. Micromass Part No – 6666661: programska oprema
- Messner C., Murkovic M. 2004. Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines. Journal of Chromatography B, 802: 19-26
- Miceli N., Trovato A., Marino A., Bellinghieri V., Melchini A., Dugo P., Cacciola F., Donato P., Mondello L., Guvenc A., De Pasquale R., Taviano M.F. 2011. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupcea* Labill. berries from Turkey. Food and Chemical Toxicology, 49: 2600-2608
- Mielnik M.B., Olsen E., Vogt G., Adeline D., Skrede G. 2006. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. LWT-Food Science and Technology, 39: 191–198
- Min B., Ahn D. U. 2005. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products -A Review. Food Science and Biotechnology, 14, 1: 152-163
- Min B., Nam K.C., Cordray J., Ahn D.U. 2008. Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin and chicken breast and thigh meats. Journal of Food Science, 73, 6: 439-446
- Moore V.J. 1988. Effect of packaging and display variables on retail display of frozen lamb chops. Meat Science, 22, 4: 313-320
- Morales – Aizpurúa I. K., Tenuta- Filho A. 2005. Oxidation of cholesterol in mayonnaise during storage. Food Chemistry, 89: 611-615
- Morrissey P. A., Sheehy P. J. A., Galvin K., Kerryh J. P., Buckleyh D. J. 1998. Lipid stability in meat and meat products. Meat Science, 49: 73-86

- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63
- Murkovic M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model system. *Journal of Chromatography B*, 802: 3-10
- Murkovic M., Steinberger D., Pfannhauser W. 1998. Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A-Food Research and Technology*, 207, 6: 477-4804
- Nagao M. 1999. A new approach to risk estimation of food-borne carcinogens – heterocyclic amines – based on molecular information. *Mutation Research*, 431: 3-12
- Nagao M. 2000. Mutagenicity. V: Food borne carcinogens: Heterocyclic amines. Nagao M., Sugimura T. (eds.) Chichester, John Wiley&Sons, LTD: 163-196
- Nam K.C., Du M., Jo C., Ahn D.U. 2001. Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time. *Meat Science*, 58: 431-435
- Oguri A., Suda M. Totuska Y., Sugimura T., Wakabayashi K. 1998. Inhibitory effects of antioxidants on formation of heterocyclic amines. *Mutation Research*, 402: 237-245
- Oz F., Kaban G., Kaya M. 2007. Effects of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines of two different species trout. *Food Chemistry*, 104: 67-71
- Oz F., Kaban G., Kaya M. 2010. Effects of cooking methods and levels on formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and fish with Oasis extraction method. *Food Science and Technology*, 43: 1345-1350
- Oz F., Kaya M. 2011. The inhibitory effects of black pepper on formation of heterocyclic amines in high-fat meatball. *Food Control*, 22: 596-600
- Pais P., Knize M.G. 2000. Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. *Journal of Chromatography B*, 747: 139-169
- Pais P., Salmon C.P., Knize M.G. Felton J.S. 1999. Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in dry-heated model system, meat and meat drippings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 1098-1108
- Paniangvait P., King A.J., Jones A.D., German B.G. 1995. Cholesterol oxides in food of animal origin. *Journal of Food Science*, 60, 6: 1159-1174
- Park P.W., Goins R.E. 1994. *In situ* preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science*, 59, 6: 1262-1266
- Pavčnik U. 2013. Vpliv dodatka rastlinskih ekstraktov rožmarina in skorje bora na preprečevanje tvorbe oksidacije govejih sekljancev. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 46 str.
- Penko A., Polak T., Lušnic Polak M., Požrl T., Kakovič D., Žlender B., Demšar L. 2015. Oxidative stability of n-3-enriched chicken patties under different package-atmosphere conditions. *Food Chemistry*, 168: 372-382
- Persson E., Graziani G., Ferracane R., Fogliano V., Skog K. 2003. Influence of antioxidant in virgin oil on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 1587-1597

- Perumalla A.V.S., Hettiarachchy N.S. 2011. Green tea and grape seed extracts – Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, 44: 827-839
- Pexara E.S., Metaxopoulos J., Drosinos E.H. 2002. Evaluation of shelf life of cured, cooked, sliced turkey fillets and cooked pork sausages—'piroski'—stored under vacuum and modified atmospheres at +4 and +10 °C. *Meat Science*, 62: 33–43
- Pie J. E., Spahis K., Seillan C. 1991. Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 250-254
- Poirot M., Silvente-Poirot S. 2013. Cholesterol-5,6-epoxides: Chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer. *Biochimie*, 95: 622-631
- Polak T., Andrenšek, Žlender B., Gašperlin L. 2009. Effects of ageing and low internal temperature of grilling on formation of heterocyclic amines in *beef longissimus dorsi* muscle. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 256-264
- Polak T., Došler D., Žlender B., Gašperlin L. 2008. Heterocyclic amines in aged and thermally treated pork *longissimus dorsi* muscle of normal and PSE quality. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 504-513
- Polak T., Rajar A., Gašperlin L., Žlender B. 2008. Cholesterol concentration and fatty acid profile of red deer (*Cervus elaphus*) meat. *Meat Science*, 80: 864–869
- Quelhas I., Petisca C., Viegas O., Melo A., Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O. 2010. Effects of green tea marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of pan-fried beef. *Food Chemistry*, 122: 98-104
- Rhee K.S., Anderson L.M., Sams A.R. 1996. Lipid oxidation potential of beef, chicken, and pork. *Journal of Food Science*, 61: 8-12
- Rodriguez-Estrada M.T., Penazzi G., Caboni M.F., Bertacco G., Lercker G. 1997. Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburgers. *Meat Science*, 45: 365–375
- Roura E., Andrés-Lacueva C., Estruch R., Lamuela-Raventós R.M. 2006. Total polyphenol intake estimated by a modified Folin-Ciocalteu assay of urine. *Clinical Chemistry*, 52: 749-752
- Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalnokemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 376 str.
- Rymer C., Givens D.I. 2005. Omega-3 fatty acid enrichment of edible tissue of poultry: A review. *Lipids*, 40: 121–130
- Saldanha T., Bragagnolo N. 2008. Relation between types of packaging, frozen storage and grilling on cholesterol and fatty acids oxidation in Atlantic hake fillets (*Merluccius hubbsi*). *Food Chemistry*, 106: 619-627
- Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S. 1997. Effects of marinating on heterocyclic amines carcinogen formation in grilled chicken. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 433-441
- Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S. Zhao B., Seow A. 2006. Heterocyclic aromatic amines in domestically prepared chicken and fish from Singapore Chinese households. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 484-492

- Salmon C.P., Knize M.G., Panteleakos F.N., Wu R.W., Nelson D.O., Felton J.S. 2000. Minimization of heterocyclic amines and thermal inactivation of *Escherichia coli* in fried ground beef. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 21: 1773-1778
- SAS Software, Version 8.01. 1999. User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.: programska oprema
- Sasikumar B. 2001. Rosemary. V: *Handbook of herbs and spices*. Vol. 2. Peter K. V. (ed.). Abington, Woodhead Publishing Ltd: 243-255
- Schut H.A., Snyderwine E.G. 1999. DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 20, 3: 353-368
- Selani M.M., Contreras- Castillo C.J., Shirahigue L.D., Gallo C.R. 2011. Wine industry residues extracts as natural antioxidant in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat Science*, 88: 397-403
- Sentellas S., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T. 2004. Optimization of clean-up procedure for determination of heterocyclic aromatic amines in urine by field-amplified sample injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1032, 1-2: 193-201
- Shin H.S. 2005. Influence of food ingredients on the formation of heterocyclic aromatic amine in cooked pork patties. *Food Science and Biotechnology*, 14: 572-575
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191
- Singh R., Chatli M.K., Biswas A.K., Sahoo J. 2011. Quality and storage stability of chicken meat patties incorporated with linseed oil. *Journal of Food Quality*, 34: 352-362
- Skog K. 1990. Use of sugar to prevent formation of carcinogenic substances in frying and roasting meat. *Kemisk Tidskrift*, 102, 2: 16-18
- Skog K. 2002. Problems associated with determination of heterocyclic amines in cooked foods and human exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1197-1203
- Skog K. 2004. Blue cotton, blue rayon and blue chitin in the analysis of heterocyclic aromatic amines – a review. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 39-44
- Skog K., Augustsson K., Steineck G., Stenberg M., Jägerstad M. 1997. Polar and non-polar heterocyclic amines in cooked fish and meat products and their corresponding pan residues. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 6: 555-565
- Skog K., Eneroth A., Svanberg M. 2003. Effects of different cooking methods on the formation of food mutagens in meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 3: 313-323
- Skog K., Johansson M.A.E., Jägerstad M.I. 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in model system and cooked foods: A review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 879-896
- Solyakov A., Skog K. 2002. Screening for heterocyclic amines in chicken cooked in various ways. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1205-1211

- Souza F.V.L., Silva F.R.S.S. 2006. Dietary vitamin E supplementation on cholesterol and cholesterol oxides of pig meat and cooked ham. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 2: 197-205
- Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M. 2004. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*, 95: 290-299
- Sugimura T. 1997. Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutation Research*, 376: 211-219
- Sugimura T., Adamson R.H. 2000. Introduction. V: Food borne carcinogens: Heterocyclic amines. Nagao M., Sugimura T. (eds.) Chichester, John Wiley & Sons, LTD: 1-4
- Tai C.-Y., Chen Y.C., Chen B.H. 1999. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (Part I). *Journal of Food and Drug Analysis*, 7, 4: 243-257
- Tai C.-Y., Chen Y.C., Chen B.H. 2000. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (Part II). *Journal of Food and Drug Analysis*, 8, 1: 1-15
- Taviano M.F., Marino A., Trovato A., Bellinghieri V., Melchini A., Dugo P., Cacciola F., Donato P., Mondello L., Guvenc A., De Pasquale R., Miceli N. 2013. *Juniperus oxycedrus L. subsp. oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus L. subsp. macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. "berries" from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology*, 58: 22-29
- Taylor R.T., Fultz E., Shore V. 1984 a. Mutagen formation in a model beef boiling system. 1. Conditions with a soluble beef-derived fraction. *Journal of Environmental Science and Health*, 19, 7: 791-817
- Taylor R.T., Shore V., Fultz E. 1984 b. Mutagen formation in a model beef boiling system. 2. Effects of proteolysis and comparison of soluble fractions from several protein-sources. *Journal of Environmental Science and Health*, 19, 7: 819-845
- Turner K., Razzazi-Fazeli E., Wagner K.H., Elmadfa I., Luf W. 2007. Determination of cholesterol oxidation products in raw and processed beef and pork preparations. *European Food Research and Technology*, 224: 797-800
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y.F. 2000. Single cell growth gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-211
- Toribio F., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T. 2000. Determination of heterocyclic aromatic amines in meat extracts by liquid chromatography-ion-trap atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 869: 307-317
- Turesky R.J. 2005. Interspecies metabolism of heterocyclic aromatic amines and the uncertainties in extrapolation of animal toxicity data for human risk assessment. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49: 101-117

- Turesky R.J. 2007. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters*, 168: 219-227
- Turesky R.J. 2010. Heterocyclic aromatic amines. Potential human carcinogens. V: *Advances in molecular toxicology*. Vol. 4. Fishbein J.C. (ed.). Amsterdam, Elsevier. 4: 37-83
- Turesky R.J., Lang N.P., Butler M.A., Teitel C.H., Kadlubar F.F. 1991. Metabolic-activation of carcinogenic heterocyclic aromatic-amines by human liver and colon. *Carcinogenesis*, 12, 10: 1839-1845.
- Turesky R.J., Vouros P. 2004. Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine–DNA adducts *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 155-166
- Ubhayasakera S.J.K.A., Verleyen T., Dutta P.C. 2004. Evaluation of GC and GC-MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chemistry*, 84: 149-157
- Uhl M., Helma C., Knasmüller S. 1999. Single-cell gel electrophoresis assay with human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutation Research*, 441: 215-224
- Valencia I., Ansorena D., Astiasaran I. 2006. Nutritional and sensory properties of dry fermented sausages enriched with *n*-3 PUFAs. *Meat Science*, 72: 727–733
- Valentin-Severin I., Le Hegarat L., Lhuguenot J.C., Le Bon A.M., Chagnon M.C. 2003. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research*, 536, 1-2: 79-90
- Valenzuela A., Sanhueza J., Alonso P., Corbari A., Nieto S. 2004. Inhibitory action of conventional food-grade natural antioxidants and of natural antioxidants of new development on the thermal-induced oxidation of cholesterol. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55, 2: 155-162
- Valenzuela A., Sanhueza J., Nieto S. 2003. Cholesterol oxidation: Health hazard and the role of antioxidants in prevention. *Biological Research*, 36: 291-302
- Vicente S.J.V., Torres E.A.F.S. 2007. Formation of four cholesterol oxidation products and loss of free lipids, cholesterol and water in beef hamburgers as a function of thermal processing. *Food Control*, 18: 63–68
- Viegas O., Žegura B., Pezdric M., Novak M., Ferreira M.P.L.V.O.I., Pinho O., Filipič M. 2012. Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines MeIQx and PhIP in bacteria and in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 949-955
- Vitaglione P., Fogliano V. 2004. Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines. *Journal of Chromatography B*, 802: 189-199
- Wakabayashi K., Nagao M., Esumi H., Sugimura T. 1992. Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Research*, 52, 7: 2092-2098
- Wakabayashi K., Sugimura T. 1998. Heterocyclic amines formed in the diet: Carcinogenicity and its modulation by dietary factors. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 9: 604-612

- Wakabayashi K., Ushiyama H., Takahashi M., Nukaya H., Kim S.B., Hirose M., Ochiai M., Sugimura T., Nagao M. 1993. Exposure to heterocyclic amines. *Environmental Health Perspectives*, 99: 129-133
- Warzecha L., Janoszka B., Blaszczyk U., Strozyk M., Bodzek D., Dobosz C. 2004. Determination of heterocyclic aromatic amines content in samples of household-prepared meat dishes. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 95-106
- Wilson B.R., Pearson A.M., Shorland F.B. 1976. Effect of total lipids and phospholipids on warmed-over flavor in red and white muscle from several species as measured by thiobarbituric acid analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24: 7-11
- Witte V.C., Krauze G.F., Bailey M.E. 1970. A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *Journal of Food Science*, 35: 582-585
- Wood J.D., Richardson R.I., Nute G.R., Fisher A.V., Campo M.M., Kasapidou E., Sheard P.R., Enser M. 2004. Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Science*, 66: 21-32
- Woods V.B., Fearon E.A. 2009. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs. *Livestock Science*, 126: 1-20
- Wyss M., Kaddurah-Daouk R. 2000. Creatine and creatine metabolism. *Physiological Reviews*, 80, 3: 1107-1213
- Yamazoe Y., Zenser T.V., Miller D.W., Kadlubar F.F. 1988. Mechanism of formation and structural characterization of DNA adducts derived from peroxidative activation of benzidine. *Carcinogenesis*, 9, 9: 1635-1641
- Yesil-Celiktas O., Ganzer M., Akgun I., Sevimli C., Kormaz K., Bedir E. 2009. Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89: 1339-1345
- Zamora R., Alcón E., Hidalgo F.J. 2013. Comparative formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in creatinine/phenylalanine and creatinine/phenylalanine/4-oxo-2-nonenal reaction mixture. *Food Chemistry*, 138: 180-185
- Zelenik-Blatnik A. 1992. Kemične spremembe triacilglicerolov v živilih. V: Lipidi. 14. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 4.-5. junij 1992. Klofutar C., Žlender B., Hribar J., Plestenjak A. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 17-27
- Zhang W., Xiao S., Samaraweera H., Lee E. J., Ahn D. U. 2010. Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86: 15-31
- Žlender B. 2000. Oksidacija in stabilnost mesa in mesnin. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26 – 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 129-138

ZAHVALA

Življenje brez izzivov in ciljev je prazno... Sprejela sem izziv in tako vnovič preizkusila svojo vztrajnost in trmo. Predvsem sama sebi sem ponovno dokazala, da zmorem, čeprav pot do tega cilja včasih ni bila lahka.

Zavedam se, da vsem tem izzivom velikokrat sama ne bi bila kos, zato se iskreno zahvaljujem vsem, ki ste mi pri tem kakorkoli pomagali.

Na prvem mestu bi se rada zahvalila vama, mama in ata, ki sta verjela vame in niti za trenutek nista pomislila, da tega cilja ne bi dosegla. Hvala vama predvsem za veliko mero potrpežljivosti in vso podporo, ki sta mi jo nudila v najtežjih trenutkih.

Velika zahvala gre mentorici prof.dr. Lei Demšar, ki je ogromno pripomogla k temu, da sem bila kos vsem izzivom in dosegla ta cilj. Hvala za vso strokovno podporo ter nasvete in nesebično pomoč pri oblikovanju doktorske disertacije, predvsem pa za vso potrpežljivost in besede vzpodbude.

Iskrena hvala tudi somentorici doc.dr. Bojani Žegura za strokovno pomoč, nasvete in potrpežljivost tekom laboratorijskega dela ter skrben pregled in nasvete pri oblikovanju doktorske disertacije. Hvala tudi ostalim zaposlenim v Laboratoriju za genetsko toksikologijo in biologijo raka za nesebično pomoč.

Zahvalila bi se tudi doc.dr. Tomažu Polaku za strokovno pomoč tekom laboratorijskega dela ter pri obdelavi podatkov ter vse nasvete in konstruktivne pogovore tekom raziskovalnega dela.

Hvala tudi ostalim zaposlenim na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil, še posebej vama, Mateja in Mojca, ki sta mi priskočili na pomoč pri delu v laboratoriju.

Za skrben pregled in priporočila pri oblikovanju doktorske disertacije se zahvaljujem tudi vsem članom komisije, prof.dr. Blažu Cigiću, prof.dr Metki Filipič in prof.dr. Božidarju Žlendru.

Prav tako se za skrben pregled doktorske disertacije zahvaljujem Lini Burkan Makivić, univ.dipl.inž.živil.tehnol.

Moja zahvala gre tudi podjetju Pivka perutninarstvo d.d., ki mi je sploh dalo možnost, da sem se s tem izzivom lahko sploh spoprijela. Posebej hvala mojim najbližjim sodelavcem, ki so bili v času moje odsotnosti pripravljeni prevzeti del mojih obveznosti. Velika zahvala tudi nekaterim ostalim zaposlenim, ki so mi v najtežjih trenutkih znali prisluhniti in me vzpodbujali, ker so vedeli, da zmorem. Brez vas bi bila ta pot še težja.

Nenazadnje pa hvala tudi vsem mojim prijateljem in znancem, ki ste velikokrat bolj verjeli v moj uspeh kot pa jaz sama. Hvala za vse iskrene pogovore, pozitivne misli in besede. Brez vas bi bila pot do uresničitve tega cilja bistveno težja. To znajo le pravi prijatelji!

Raziskavo je delno financirala Evropska unija, in sicer iz Evropskega socialnega sklada.



PRILOGE

Priloga A: Sklop I: Karakterizacija rastlinskih ekstraktov

Annex A: Part I: Characterization of plant extracts

Priloga A.1: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu rožmarina (nabran na območju Kopra)

Annex A.1: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in rosemary ethanol extract (area of Koper)

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
ROŽ4	siringinska kislina	2,12
	katehin	6,78
	epikatehin	30,42
	galokatehin	94,89
	nepetrin	42,36
	hesperidin	22,03
	luteolin-3-glukuronid	67,78
	rožmarinska kislina	118,62

Priloga A.2: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu rožmarina (Kotanyi)

Annex A.2: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in rosemary ethanol extract (Kotanyi)

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
ROŽ2	siringinska kislina	3,92
	katehin	15,67
	epikatehin	56,27
	galokatehin	175,56
	nepetrin	156,75
	hesperidin	40,75
	luteolin-3-glukuronid	144,21
	rožmarinska kislina	391,87

Priloga A.3: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu rožmarina (Maestro)

Annex A.3: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in rosemary ethanol extract (Maestro)

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
ROŽ3	siringinska kislina	3,70
	katehin	11,82
	epikatehin	53,06
	galokatehin	165,55
	nepetrin	162,59
	hesperidin	38,43
	luteolin-3-glukuronid	135,98
	rožmarinska kislina	413,87

Priloga A.4: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu lubja črnega bora (Vremščica)

Annex A.4: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in the bark of black pine ethanol extract (Vremščica)

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
LB2	protokatehinska kislina	173,05
	katehin	90,95
	epikatehin	37,73
	astilbin	0,00
	taksifolin	696,27

Priloga A.5: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu lubja rdečega bora

Annex A.5: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in the bark of red pine ethanol extract

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
LB4	protokatehinska kislina	209,35
	katehin	124,71
	epikatehin	15,85
	astilbin	45,38
	taksifolin	191,72

Priloga A.6: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu lubja zelenega bora

Annex A.6: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in the bark of green pine ethanol extract

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
LB5	protokatehinska kislina	81,75
	katehin	118,55
	epikatehin	27,03
	astilbin	53,26
	taksifolin	478,89

Priloga A.7: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu lubja rdečega bora

Annex A.7: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in the bark of red pine ethanol extract

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
LB6	protokatehinska kislina	163,08
	katehin	126,39
	epikatehin	0,00
	astilbin	0,00
	taksifolin	2679,22

Priloga A.8: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu grozdnih pešk sorte Refošk

Annex A.8: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in grape seed ethanol extract of variety Refošk

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
GP1	siringinska kislina	0,00
	galna kislina	131,94
	protokatehinska kislina	3,79
	vanilin	0,57
	katehin	727,32
	klorogenska kislina	0,00
	kofeinska kislina	0,42
	epikatehin	550,88
	rutin	0,00
	elagična kislina	2,30
	p-kumarna kislina	21,15
	salicilna kislina	3,75
	kvercetin	0,00
	luteolin	0,00
	naringenin	0,00
	galangin	0,00

Priloga A.9: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu jabolčnih tropin sorte Gloster

Annex A.9: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in apple pomace ethanol extract of variety Gloster

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
JT2	siringinska kislina	0,00
	galna kislina	0,00
	protokatehinska kislina	0,52
	vanilin	0,00
	katehin	0,00
	klorogenska kislina	0,00
	kofeinska kislina	0,00
	epikatehin	2,17
	rutin	0,84
	elagična kislina	0,00
	p-kumarna kislina	0,00
	salicilna kislina	0,00
	kvercetin	0,93
	luteolin	0,00
	naringenin	0,00
	galangin	0,00

Priloga A.10: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu jabolčnih tropin sorte Mutsu

Annex A.10: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in apple pomace ethanol extract of variety Mutsu

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
JT3	siringinska kislina	0,00
	galna kislina	0,00
	protokatehinska kislina	0,74
	vanilin	0,00
	katehin	0,00
	klorogenska kislina	0,34
	kofeinska kislina	0,00
	epikatehin	0,00
	rutin	0,69
	elagična kislina	0,00
	p-kumarna kislina	0,00
	salicilna kislina	0,00
	kvercetin	0,00
	luteolin	0,00
	naringenin	0,00
	galangin	0,00

Priloga A.11: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu grozdnih tropin sorte Refošk

Annex A.11: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in grape marc ethanol extract of variety Refošk

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
GT1	siringinska kislina	2,88
	galna kislina	82,83
	protokatehinska kislina	3,59
	vanilin	0,84
	katehin	260,23
	klorogenska kislina	0,00
	kofeinska kislina	0,66
	epikatehin	182,42
	rutin	0,27
	elagična kislina	1,87
	p-kumarna kislina	14,45
	salicilna kislina	9,14
	kvercetin	0,00
	luteolin	0,00
	naringenin	0,00
	galangin	0,00

Priloga A.12: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu oljčnih tropin sorte Črnica

Annex A.12: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in olive-pomace ethanol extract of variety Črnica

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
OT2	siringinska kislina	95,30
	galna kislina	3,15
	protokatehinska kislina	0,80
	vanilin	38,34
	katehin	3,41
	klorogenska kislina	0,00
	kofeinska kislina	0,14
	epikatehin	1,84
	rutin	0,56
	elagična kislina	0,68
	p-kumarna kislina	31,02
	salicilna kislina	4,63
	kvercetin	0,00
	luteolin	25,80
	naringenin	1,26
	galangin	7,33

Priloga A13: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu oljčnih tropin sorte Belica

Annex A.13: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in olive-pomace ethanol extract of variety Belica

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
OT1	siringinska kislina	233,88
	galna kislina	0,00
	protokatehinska kislina	1,79
	vanilin	52,23
	katehin	0,00
	klorogenska kislina	0,00
	kofeinska kislina	0,22
	epikatehin	3,33
	rutin	11,00
	elagična kislina	0,00
	p-kumarna kislina	33,37
	salicilna kislina	31,07
	kvercetin	0,00
	luteolin	59,85
	naringenin	0,72
	galangin	10,39

Priloga A.14: Koncentracija posameznih fenolnih spojin (mg/l) v etanolnem ekstraktu brinovih jagod
Annex A.14: The concentration of individual phenolic compounds (mg l⁻¹) in juniper berries ethanol extract

Vzorec	fenolna spojina	koncentracija v ekstraktu (mg/l)
BR4	siringinska kislina	0,00
	galna kislina	4,85
	protokatehinska kislina	1,37
	vanilin	0,00
	katehin	22,31
	klorogenska kislina	0,50
	kafeinska kislina	0,00
	epikatehin	5,81
	rutin	9,47
	elagična kislina	0,00
	p-kumarna kislina	4,43
	salicilna kislina	3,67
	kvercetin	0,00
	luteolin	0,78
	naringenin	1,07
	galangin	3,19
	apigenin	2,50
	kupreso flavon (cupreso flavone)	4,46
	apigenin-7-glukozid	1,46
	kvercetin-3-rutinozid	22,82
hipolaetin-7-pentozid	142,09	

Priloga B: Sklop II: Vezava rastlinskih ekstraktov na različne nosilce in njihov vpliv na tvorbo HAA v piščančjih sekljancih, obogatenih z *n-3* VNMK

Annex B: Part II: Binding of plant extracts on various media and their influence on the formation of HAA in chicken patties, enriched with *n-3* PUFA

Priloga B.1: Vpliv načina toplotne obdelave/dosežene središčne temperature in dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n-3*–obogatitev) na vsebnost ($\mu\text{g}/\text{kg}$) posameznih in skupnih HAA v skorji toplotno obdelanih piščančjih filejev

Annex B.1: Effects of type of thermal treatment/internal temperature and ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n-3* enriched) on content ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of individual and total heterocyclic amines in surface layer of thermally treated chicken fillets

Obogatitev	običajen	<i>n-3</i>	$p_E(\text{SEM})$	običajen	<i>n-3</i>	$p_E(\text{SEM})$	običajen	<i>n-3</i>	$p_E(\text{SEM})$
Način/HAA	MeIQ			MeIQx			PhIP		
IR/82°C	0,30 ^B	0,03 ^C	nz(0,30)	1,19	1,12	nz(0,67)	1,88 ^B	0,23 ^C	nz(1,57)
IR/95°C	2,11 ^{BA}	0,58 ^{CB}	nz(1,69)	7,55	5,54	nz(5,24)	17,51 ^{BA}	5,19 ^{CB}	nz(12,63)
pečica/82°C	0,00 ^B	0,85 ^{CB}	nz(0,85)	0,78	0,63	nz(0,62)	1,30 ^B	0,80 ^C	nz(0,78)
pečica/95°C	0,09 ^B	0,00 ^C	nz(0,11)	2,38	1,94	nz(1,21)	1,56 ^B	1,35 ^C	nz(1,04)
žar/82°C	2,54 ^{BA}	1,45 ^B	nz(0,51)	3,67	3,30	nz(0,71)	17,81 ^{BA}	12,92 ^B	nz(2,83)
žar/95°C	5,23 ^A	3,03 ^A	nz(2,28)	7,07	4,15	nz(3,79)	34,84 ^A	28,69 ^A	nz(12,00)
$p_{TO}(\text{SEM})$	*(1,79)	*** (0,54)		nz(3,32)	nz(2,57)		*(10,40)	*** (4,18)	
	4,8-DiMeIQ			7,8-DiMeIQ			Harman		
IR/82°C	0,04	0,01 ^B	nz(0,02)	0,01 ^B	0,01	nz(0,01)	0,16	0,10	nz(0,07)
IR/95°C	0,31	0,09 ^B	nz(0,27)	0,18 ^B	0,09	nz(0,14)	1,20	0,55	nz(0,81)
pečica/82°C	0,01	0,02 ^B	nz(0,01)	0,03 ^B	0,05	nz(0,03)	0,44	0,36	nz(0,09)
pečica/95°C	0,08	0,03 ^B	nz(0,07)	0,09 ^B	0,04	nz(0,04)	2,05	2,66	nz(2,39)
žar/82°C	0,34	0,25 ^B	nz(0,07)	0,20 ^B	0,17	nz(0,10)	1,89	1,04	nz(0,63)
žar/95°C	0,37	0,63 ^A	nz(0,41)	0,69 ^A	0,29	nz(0,34)	4,56	2,91	nz(3,40)
$p_{TO}(\text{SEM})$	nz(0,28)	*** (0,12)		*(0,222)	nz(0,09)		nz(1,730)	nz(1,42)	
	Norharman			Glu-P-2			IQ		
IR/82°C	0,10	0,06	nz(0,05)	0,04 ^B	0,03 ^C	nz(0,04)	0,02	0,01	nz(0,01)
IR/95°C	1,02	0,55	nz(0,69)	0,89 ^{BA}	0,18 ^{CB}	nz(1,01)	0,21	0,04	nz(0,20)
pečica/82°C	0,64	0,54	nz(0,14)	0,11 ^B	0,09 ^C	nz(0,06)	0,07	0,18	nz(0,13)
pečica/95°C	2,55	3,97	nz(3,59)	0,27 ^{BA}	0,32 ^{CB}	nz(0,21)	0,80	0,48	nz(0,74)
žar/82°C	1,42	0,88	nz(0,37)	1,19 ^{BA}	0,75 ^B	nz(0,31)	0,34	0,14 ^b	nz(0,08)
žar/95°C	3,79	2,40	nz(1,96)	2,37 ^A	2,07 ^A	nz(1,20)	2,29	0,51	nz(1,42)
$p_S(\text{SEM})$	nz(1,67)	nz(2,03)		nz(1,011)	*** (0,30)		nz(0,988)	nz(0,27)	
	IQx			AaC			vsota		
IR/82°C	0,13 ^{BC}	0,12 ^{BC}	nz(0,08)	0,01	0,01	nz(0,01)	3,86 ^B	1,72 ^B	nz(2,67)
IR/95°C	1,37 ^{BA}	1,34 ^{BA}	nz(1,04)	0,30	0,16	nz(0,20)	32,64 ^{BA}	14,31 ^B	nz(23,32)
pečica/82°C	0,01 ^C	0,01 ^C	nz(0,01)	0,01	0,01	nz(0,01)	3,38 ^B	3,53 ^B	nz(1,08)
pečica/95°C	0,19 ^{BC}	0,15 ^{BC}	nz(0,10)	0,05	0,03	nz(0,03)	10,10 ^B	10,96 ^B	nz(6,54)
žar/82°C	1,38 ^{BA}	1,25 ^{BAC}	nz(0,32)	0,09	0,07	nz(0,01)	30,87 ^{BA}	22,21 ^B	nz(5,41)
žar/95°C	1,74 ^A	2,44 ^A	nz(1,85)	0,13	0,11	nz(0,04)	63,06 ^A	47,20 ^A	nz(24,97)
$p_{TO}(\text{SEM})$	*(0,62)	** (0,61)		nz(0,11)	nz(0,05)		*(20,12)	** (9,61)	

značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p \leq 0,05$ statistično neznačilen vpliv; p_E – statistična verjetnost vpliva obogatitve prehrane z *n-3* VNMK; p_{TO} – statistična značilnost vpliva načina toplotne obdelave; SEM, standardna napaka povprečja; srednje vrednosti z različno črko (^{A,B,C}) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo (značilnost razlik med načini toplotne obdelave)

levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz – $p \leq 0,05$ statistically not significant; p_E , statistical probability of enrichment effect; p_{TO} , statistical probability of thermal treatment/degree of doneness; SEM, standard error of mean; means with a different superscript within rows (^{A,B,C}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between different types of thermal treatment/degree of doneness)

Priloga B.2: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n-3*–obogatitve mesa) na senzorične lastnosti mariniranih malih filejih piščancev po pečenju na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR

Annex B.2: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n-3* enriched) on sensory properties marinated little chicken file after thermal treatment at two-plated grill, oven and IR oven

Parameter (1-7)	TO IR			pečica			žar			
	Ts	kontrola	<i>n-3</i>	p_E (SEM)	kontrola	<i>n-3</i>	p_E (SEM)	kontrola	<i>n-3</i>	p_E (SEM)
barva	95	5,5	5,7	nz(0,2)	4,5	4,8	nz(0,9)	5,1	5,2	nz(0,7)
	82	3,8	3,8	nz(0,5)	3,0	2,8	nz(0,3)	5,1	5,0	nz(0,6)
tekstura	95	5,5	5,4	nz(0,5)	5,2	5,3	nz(0,3)	4,7	4,7	nz(0,4)
	82	4,0 ^B	4,4 ^A	* (0,3)	4,2	4,3	nz(0,3)	4,4	4,4	nz(0,4)
tuji vonji	95	1,4	1,3	nz(0,5)	1,3	1,4	nz(0,2)	1,8 ^A	1,4 ^B	*** (0,2)
	82	1,5 ^B	2,3 ^A	** (0,3)	1,5 ^B	2,0 ^A	* (0,4)	2,8 ^A	1,3 ^B	*** (0,5)
tuje arome	95	1,6	1,3	nz(0,6)	1,5	1,6	nz(0,4)	2,4	1,9	nz(0,8)
	82	1,1 ^B	1,8 ^A	*** (0,3)	1,0 ^B	1,5 ^A	* (0,4)	1,3	1,2	nz(0,4)

SEM, standardna napaka povprečja; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; p_E , statistična verjetnost vpliva *n-3*–obogatenja krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med kontrolnimi sekljanci in sekljanci iz *n-3*–obogatene mesa)

SEM, standard error of mean; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant p_E , statistical probability of enrichment effect

Priloga B.3: Vpliv dodatka različnih rastlinskih ekstraktov in nosilcev teh ekstraktov na vsebnost (µg/kg) posameznih in skupnih HAA v pečenih sekljancih iz mesa piščancev, krmljenih z dodatkom mletega lanenega semena (*n*-3) in brez dodatka (običajen)

Annex B.3: Effects of different plant extract addition and used carriers of those extracts on content (µg kg⁻¹) of some individual and total HAA of roasted patties, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n*-3 enriched) and without (control)

Obogatitev običajen			<i>n</i> -3			običajen			<i>n</i> -3			
ekstrakt	škrob	sol	<i>p</i> _N (SEM)	škrob	sol	<i>p</i> _N (SEM)	škrob	sol	<i>p</i> _N (SEM)	škrob	sol	<i>p</i> _N (SEM)
MeIQ						MeIQx						
kontrola	0,70 ^{aBA}	0,01 ^{bE}	**(0,29)	0,26 ^{aCD}	0,00 ^{bF}	**(0,10)	1,18 ^{BAC}	0,73 ^D	nz(0,61)	2,47 ^a	0,68 ^{bC}	*(0,80)
BR1	0,34 ^{BC}	1,16 ^{BA}	nz(0,36)	0,61 ^{BA}	0,92 ^{CB}	nz(0,08)	1,18 ^{bBAC}	13,48 ^{aA}	*** (0,21)	1,32 ^b	17,11 ^{aA}	*** (1,01)
BR2	0,58 ^{BAC}	0,77 ^{BDAC}	nz(0,14)	0,46 ^{bBC}	1,02 ^{aCB}	*(0,07)	1,27 ^{bBAC}	7,84 ^{aBC}	*(1,21)	0,89 ^b	13,43 ^{aA}	*** (1,14)
BR3	0,93 ^A	1,09 ^{BAC}	nz(0,28)	0,15 ^D	0,86 ^{CB}	nz(0,21)	1,55 ^{BA}	10,75 ^{aBA}	*(0,99)	0,95	4,33 ^{CB}	nz(0,88)
LB1	0,31 ^{bBC}	0,80 ^{ABDA}	**(0,03)	0,33 ^{CD}	1,82 ^A	nz(0,44)	0,72 ^{BC}	2,13 ^{CD}	nz(2,14)	1,04	13,68 ^A	nz(3,50)
LB2	0,36 ^{BC}	0,51 ^{EBDC}	nz(0,52)	0,40 ^{BCD}	1,24 ^B	nz(0,38)	1,26 ^{BAC}	5,44 ^{BCD}	nz(5,44)	0,98	4,24 ^{CB}	nz(2,69)
LB3	0,83 ^A	0,52 ^{EBDC}	nz(0,13)	0,37 ^{bBCI}	0,50 ^{aCFEI}	*(0,03)	0,94 ^{BAC}	1,83 ^{CD}	nz(1,22)	1,32	2,43 ^{CB}	nz(0,35)
LB4	0,24 ^{BC}	0,31 ^{ED}	nz(0,05)	0,32 ^{CD}	0,86 ^{CB}	nz(0,18)	0,70 ^{bBC}	1,77 ^{aD}	*(0,18)	0,91	2,53 ^{CB}	nz(0,55)
LB5	0,49 ^{BAC}	0,27 ^{ED}	nz(0,13)	0,19 ^D	0,30 ^{FED}	nz(0,11)	1,24 ^{BAC}	1,03 ^D	nz(0,28)	0,70 ^b	1,86 ^{aCB}	*** (0,11)
LB6	-	0,53 ^{EBDC}	-	-	0,16 ^{FE}	-	-	1,85 ^{CD}	-	-	1,60 ^C	-
ROŽ1	0,28 ^{BC}	0,29 ^{ED}	nz(0,30)	0,72 ^{aA}	0,00 ^{bF}	*(0,11)	0,85 ^{BAC}	3,53 ^{CD}	nz(3,53)	1,24	0,24 ^C	nz(0,32)
ROŽ2	0,64 ^{BAC}	1,22 ^A	nz(1,62)	0,27 ^{CD}	0,83 ^{CB}	nz(0,22)	1,32 ^{BA}	4,77 ^{CD}	nz(8,81)	0,72	6,59 ^B	nz(2,94)
ROŽ3	0,30 ^{BC}	0,64 ^{EBDA}	nz(0,22)	0,26 ^{CD}	0,60 ^{CE}	nz(0,13)	0,74 ^{BC}	3,01 ^{CD}	nz(1,01)	0,71 ^b	4,14 ^{aCB}	*(0,75)
ROŽ4	0,17 ^C	0,43 ^{EDC}	nz(0,08)	0,40 ^{BCD}	0,95 ^{CB}	nz(0,14)	0,52 ^{bC}	3,72 ^{aCD}	*(0,61)	0,94	4,32 ^{CB}	nz(0,79)
<i>p</i> _R (SEM)	*** (0,13)	*** (0,29)	*** (0,09)	*** (0,24)			*(0,28)	*** (2,53)		nz(0,21)	*** (2,01)	
PhIP						Harman						
kontrola	3,21 ^{bA}	29,31 ^A	*(14,29)	1,36 ^{bBA}	55,73 ^{aBA}	*** (6,60)	0,07 ^{ECD}	0,04 ^G	nz(0,04)	0,07 ^{aCE}	0,01 ^{bD}	*** (0,02)
BR1	1,48 ^{BA}	23,57 ^A	nz(9,74)	1,66 ^{BA}	30,02 ^{aDC}	*(3,32)	0,08 ^{ECD}	0,98 ^{EBDAC}	nz(0,21)	0,14 ^{BA}	1,27 ^{aCB}	*** (0,07)
BR2	2,08 ^{bBA}	17,84 ^{aA}	*(2,86)	0,65 ^{BB}	28,58 ^{aDC}	*(3,59)	0,10 ^{bBCD}	0,69 ^{aEBDA}	*(0,09)	0,09 ^{bE}	1,16 ^{aCB}	*(0,18)
BR3	3,06 ^{bA}	27,23 ^{aA}	*(1,53)	0,56 ^{BB}	19,15 ^{aD}	*(2,93)	0,19 ^{BA}	1,15 ^{aBAC}	*(0,13)	0,04 ^{bE}	0,75 ^{aCBI}	*(0,09)
LB1	1,31 ^{bBA}	26,89 ^{aA}	*(3,05)	0,57 ^B	69,20 ^A	nz(18,82)	0,04 ^{bED}	0,94 ^{aEBDA}	*(0,11)	0,04 ^{ED}	3,18 ^A	nz(0,83)
LB2	1,72 ^{bBA}	35,13 ^{aA}	*(1,27)	1,31 ^{BA}	18,23 ^D	nz(5,74)	0,08 ^{bECD}	1,23 ^{aA}	*** (0,03)	0,09 ^{CB}	0,70 ^{BCD}	nz(0,21)
LB3	2,60 ^{BA}	18,74 ^A	nz(9,47)	1,63 ^{BA}	28,91 ^{aDC}	*** (0,72)	0,15 ^{BA}	0,58 ^{EDGCF}	nz(0,31)	0,07 ^{bCB}	0,91 ^{aCB}	*** (0,06)
LB4	1,02 ^{bB}	12,23 ^{aA}	*(1,04)	1,31 ^{bBA}	20,34 ^{aD}	*(3,02)	0,04 ^{bED}	0,48 ^{aEDGF}	*(0,04)	0,05 ^{bED}	0,66 ^{aCD}	*(0,09)
LB5	2,26 ^{BA}	9,49 ^A	nz(3,94)	0,89 ^{bBA}	22,09 ^{aD}	*(2,91)	0,12 ^{bBC}	0,34 ^{aGF}	*(0,08)	0,04 ^{bE}	0,65 ^{aCD}	*(0,08)
LB6	-	19,15 ^A	-	-	27,34 ^{DC}	-	-	0,61 ^{EBDCF}	-	-	0,85 ^{CBD}	-
ROŽ1	0,90 ^{bB}	21,72 ^{aA}	*(2,37)	1,41 ^{bBA}	17,03 ^{aD}	*(2,05)	0,06 ^{ECD}	1,04 ^{BDAC}	nz(0,29)	0,13 ^{BA}	0,65 ^{aCD}	*** (0,02)
ROŽ2	2,08 ^{BA}	36,68 ^A	nz(8,81)	1,32 ^{BA}	45,60 ^{BC}	nz(12,28)	0,10 ^{BCD}	1,18 ^{BA}	nz(0,35)	0,05 ^{ED}	1,54 ^B	nz(0,53)
ROŽ3	1,30 ^{bBA}	33,28 ^{aA}	*(5,85)	0,75 ^{bB}	31,33 ^{aDC}	*(4,91)	0,05 ^{ECD}	1,14 ^{BAC}	nz(0,29)	0,06 ^{bCE}	1,02 ^{aCB}	*(0,22)
ROŽ4	0,78 ^{bB}	11,83 ^{aA}	*(2,46)	0,94 ^{bBA}	26,03 ^{aDC}	*(3,03)	0,03 ^{bE}	0,45 ^{aEGF}	*(0,09)	0,06 ^{bCE}	0,84 ^{aCBI}	*(0,13)
<i>p</i> _R (SEM)	*** (0,50)	*(8,07)	*(0,32)	*** (8,87)			*** (0,03)	*** (0,25)		*** (0,01)	*** (0,37)	
Norharman						4,8-DiMeIQ						
kontrola	0,17 ^{BDEC}	0,22 ^F	nz(0,13)	0,08 ^C	0,19 ^D	nz(0,08)	0,04 ^b	1,35 ^{aA}	*(0,61)	0,01 ^{bBA}	1,99 ^{aA}	*** (0,33)
BR1	0,14 ^{bBDEC}	1,90 ^{aBAC}	*(0,27)	0,22 ^{BA}	2,34 ^{aCB}	*(0,19)	0,02 ^b	1,13 ^{aBA}	*(0,19)	0,03 ^{BA}	1,30 ^{aBA}	*** (0,01)
BR2	0,19 ^{bBDEC}	1,28 ^{aDEC}	*(0,14)	0,13 ^{bCB}	2,29 ^{aCB}	*(0,38)	0,01 ^b	0,70 ^{aBA}	*(0,13)	0,01 ^{bBA}	1,26 ^{aBA}	*(0,27)
BR3	0,34 ^{bA}	2,12 ^{aBA}	*(0,07)	0,08 ^{bC}	1,42 ^{aCBD}	*(0,15)	0,01 ^b	1,31 ^{aBA}	*** (0,02)	0,00 ^{bC}	0,61 ^{aB}	*** (0,01)
LB1	0,09 ^{bDE}	1,71 ^{aBDA}	*(0,13)	0,08 ^C	4,99 ^A	nz(1,49)	0,02 ^b	0,98 ^{aBA}	*(0,05)	0,01 ^{BC}	1,96 ^A	nz(0,29)
LB2	0,15 ^{bBDEC}	2,22 ^{aA}	*(0,08)	0,16 ^B	1,24 ^{CD}	nz(0,34)	0,02 ^b	1,35 ^{aA}	*(0,11)	0,02 ^{BAC}	0,79 ^B	nz(0,28)
LB3	0,23 ^{BDAC}	1,05 ^{DE}	nz(0,47)	0,15 ^{BB}	1,74 ^{aCBD}	*(0,12)	0,00	0,49 ^{BA}	nz(0,22)	0,02 ^{BA}	0,66 ^{aB}	*** (0,01)
LB4	0,09 ^{bE}	0,89 ^{aFDE}	*(0,02)	0,11 ^{bCB}	1,25 ^{aCD}	*(0,13)	0,01 ^b	0,42 ^{aBA}	*(0,04)	0,01 ^{bBA}	0,61 ^{aB}	*** (0,06)
LB5	0,24 ^{bBA}	0,67 ^{aFE}	*(0,17)	0,09 ^{bC}	1,28 ^{aCD}	*(0,14)	0,01 ^b	0,31 ^{aB}	*(0,05)	0,01 ^{bBC}	0,57 ^{aB}	*** (0,03)
LB6	-	1,11 ^{DEC}	-	-	1,44 ^{CBD}	-	-	0,52 ^{BA}	-	-	0,76 ^B	-
ROŽ1	0,10 ^{bDEC}	1,36 ^{aBDE}	*(0,07)	0,22 ^{BA}	1,38 ^{aCBD}	*(0,17)	0,02 ^b	0,61 ^{aBA}	*(0,03)	0,02 ^{bBA}	0,61 ^{aB}	*(0,09)
ROŽ2	0,24 ^{BAC}	2,16 ^{BA}	nz(0,58)	0,11 ^{CB}	2,97 ^B	nz(0,99)	0,01 ^b	1,02 ^{aBA}	*(0,17)	0,01 ^{BAC}	1,23 ^{BA}	nz(0,47)
ROŽ3	0,12 ^{BDEC}	2,12 ^{BA}	nz(0,50)	0,11 ^{bCB}	2,02 ^{aCB}	*(0,41)	0,01	1,00 ^{BA}	nz(0,23)	0,01 ^{bBC}	1,06 ^{aB}	*(0,25)
ROŽ4	0,07 ^{bE}	0,89 ^{aFDE}	*(0,18)	0,12 ^{bCB}	1,70 ^{aCBD}	*(0,31)	0,01	0,58 ^{BA}	nz(0,16)	0,01 ^{bBA}	0,83 ^{aB}	*(0,08)
<i>p</i> _R (SEM)	*** (0,05)	*** (0,37)	*** (0,02)	*** (0,67)			nz(0,01)	*** (0,25)		*** (0,01)	*(0,32)	
7,8-DiMeIQ						Glu-P-2						
kontrola	0,03 ^{BA}	0,01 ^E	nz(0,02)	0,02	0,03 ^E	nz(0,02)	0,13 ^{BAC}	0,40	nz(0,43)	0,04 ^b	1,52 ^{aA}	*** (0,38)
BR1	0,02 ^{bBDC}	1,08 ^{aA}	*** (0,01)	0,02 ^b	1,00 ^{aBA}	*** (0,02)	0,10 ^{bBAC}	0,49 ^a	*(0,08)	0,08 ^b	0,69 ^{aB}	*(0,07)
BR2	0,02 ^{BAC}	0,70 ^{BAC}	nz(0,19)	0,02 ^b	0,65 ^{aC}	*** (0,06)	0,14 ^{BAC}	0,40	nz(0,09)	0,04 ^b	0,62 ^{aB}	*** (0,03)
BR3	0,02 ^{bBDA}	0,75 ^{aBA}	*(0,04)	0,01 ^b	0,99 ^{aBA}	*** (0,06)	0,19 ^{BA}	0,56 ^a	*(0,08)	0,03	0,14 ^B	nz(0,11)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.3: Vpliv dodatka različnih rastlinskih ekstraktov in nosilcev teh ekstraktov na vsebnost ($\mu\text{g/kg}$) posameznih in skupnih HAA v pečenih sekljancih iz mesa piščancev, krmljenih z dodatkom mletega lanenega semena ($n-3$) in brez dodatka (običajen)

Continuation of annex B.3: Effects of different plant extract addition and used carriers of those extracts on content ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of some individual and total HAA of roasted patties, originated from chicken fed with ground whole flaxseed ($n-3$ enriched) and without (control)

Obogatitev običajen			$n-3$				običajen			$n-3$			
ekstrakt	škrob	sol	$p_N(\text{SEM})$	škrob	sol	$p_N(\text{SEM})$	škrob	sol	$p_N(\text{SEM})$	škrob	sol	$p_N(\text{SEM})$	
7,8-DiMeIQ													
LB1	0,01 ^{BDC}	0,28 ^{EDC}	nz(0,04)	0,01	1,17 ^A	nz(0,29)	0,05 ^{BC}	0,11	nz(0,05)	0,04	0,39 ^B	nz(0,17)	
LB2	0,03 ^{bA}	0,77 ^{ABA}	*** (0,54)	0,02 ^a	0,69 ^{ABC}	** (0,06)	0,16 ^{BA}	0,18	nz(0,02)	0,05	0,24 ^B	nz(0,16)	
LB3	0,01 ^{BDC}	0,56 ^{BDC}	nz(0,15)	0,02 ^b	0,59 ^{ADC}	*(0,08)	0,14 ^{BAC}	0,30	nz(0,19)	0,07 ^b	0,49 ^{AB}	** (0,03)	
LB4	0,01 ^{bDC}	0,40 ^{ABEDC}	*(0,04)	0,01 ^b	0,40 ^{ADC}	*(0,04)	0,03 ^{bBC}	0,27 ^a	*** (0,01)	0,05	0,41 ^B	nz(0,09)	
LB5	0,02 ^{bBDC}	0,23 ^{aED}	*** (0,03)	0,02 ^b	0,45 ^{ADC}	** (0,07)	0,10 ^{BAC}	0,15	nz(0,06)	0,03 ^b	0,39 ^{AB}	** (0,04)	
LB6	-	0,61 ^{BDC}	-	-	0,62 ^C	-	-	0,37	-	-	0,59 ^B	-	
ROŽ1	0,02 ^{bBDAC}	0,43 ^{ABEDC}	** (0,01)	0,02	0,25 ^{DE}	nz(0,25)	0,10 ^{BAC}	0,15	nz(0,08)	0,07	0,03 ^B	nz(0,02)	
ROŽ2	0,01 ^{bDC}	0,56 ^{ABDC}	*** (0,01)	0,01 ^b	0,49 ^{ADC}	*** (0,01)	0,14 ^{BAC}	0,44	nz(0,09)	0,06	0,68 ^B	nz(0,17)	
ROŽ3	0,01 ^D	0,78 ^{BA}	nz(0,29)	0,01 ^b	0,49 ^{ADC}	*(0,06)	0,05 ^{bBC}	0,54 ^a	*(0,09)	0,04	0,60 ^B	nz(0,13)	
ROŽ4	0,01 ^{bD}	0,42 ^{ABEDC}	*(0,07)	0,01 ^b	0,48 ^{ADC}	** (0,03)	0,02 ^{bC}	0,24 ^a	*(0,05)	0,04	0,39 ^B	nz(0,09)	
$p_R(\text{SEM})$	*(0,01)	*** (0,18)	nz(0,01)	*** (0,16)	*** (0,04)	nz(0,16)	nz(0,02)	*(0,18)					
IQ													
kontrola	0,00	0,25	nz(0,19)	0,00 ^b	3,26 ^{aA}	** (0,25)	0,37 ^{bDFE}	2,32 ^{aA}	*** (0,43)	0,21 ^{bD}	3,26 ^{aA}	*** (0,66)	
BR1	0,00	0	nz(0,01)	0,01	0,07 ^{bB}	nz(0,01)	0,25 ^{FE}	0 ^B	nz(0,06)	0,46 ^{aA}	0,07 ^{bB}	*(0,09)	
BR2	0,02	0	nz(0,01)	0,01	0,00 ^{bB}	nz(0,02)	0,42 ^{aDC}	0,00 ^{bB}	** (0,04)	0,24 ^{aBDC}	0,00 ^{bB}	** (0,02)	
BR3	0,01 ^a	0,00 ^b	*** (0,01)	0,02	0,03 ^{bB}	nz(0,02)	0,72 ^{aA}	0,14 ^{bB}	*** (0,01)	0,20 ^{aD}	0,03 ^{bB}	** (0,01)	
LB1	0,00	0,01	nz(0,01)	0,00	0,29 ^B	nz(0,01)	0,33 ^{aDFE}	0,03 ^{bB}	** (0,03)	0,31 ^{BDC}	0,29 ^B	nz(0,13)	
LB2	0,01	0,00	nz(0,01)	0,00	0,05 ^{bB}	nz(0,21)	0,29 ^{DFE}	0,10 ^B	nz(0,06)	0,36 ^{aBAC}	0,05 ^{bB}	*(0,04)	
LB3	0,01 ^a	0,00 ^b	*(0,00)	0,00	0,00 ^{bB}	nz(0,01)	0,60 ^{aBA}	0,00 ^{bB}	*(0,07)	0,29 ^{aBDC}	0,00 ^{bB}	*(0,05)	
LB4	0,00 ^a	0,00 ^b	*(0,01)	0,00 ^a	0,00 ^{bB}	*(0,01)	0,28 ^{aDFE}	0,00 ^{bB}	*** (0,01)	0,37 ^{aBA}	0,00 ^{bB}	*(0,07)	
LB5	0,03	0	nz(0,03)	0,00	0,00 ^{bB}	nz(0,02)	0,41 ^{aDCE}	0,00 ^{bB}	** (0,07)	0,22 ^{aDC}	0,00 ^{bB}	** (0,03)	
LB6	-	0	-	-	0 ^B	-	-	0 ^B	-	-	0 ^B	-	
ROŽ1	0,00	0,00	nz(0,01)	0,01	0,01 ^{bB}	nz(0,03)	0,26 ^{DFE}	0,06 ^B	nz(0,06)	0,34 ^{aBDAC}	0,01 ^{bB}	** (0,03)	
ROŽ2	0,04	0,01	nz(0,04)	0,00 ^a	0 ^B	*** (0,01)	0,54 ^{aBC}	0,15 ^{bB}	*(0,08)	0,23 ^{BDC}	0 ^B	nz(0,06)	
ROŽ3	0,00	0	nz(0,09)	0,00 ^a	0,00 ^{bB}	*(0,01)	0,26 ^{DFE}	0 ^B	nz(0,09)	0,32 ^{aBDAC}	0,00 ^{bB}	*(0,03)	
ROŽ4	0,00 ^a	0,00 ^b	*(0,01)	0,00 ^a	0,04 ^B	** (0,00)	0,23 ^{aF}	0,04 ^{bB}	*(0,03)	0,29 ^{BDC}	0,04 ^B	nz(4,43)	
$p_R(\text{SEM})$	nz(0,02)	nz(0,06)	nz(0,01)	*** (0,08)	*** (0,07)	*** (0,13)	*** (0,06)	*** (0,20)					
skupni HAA													
kontrola	5,97 ^{bBA}	34,70 ^{aBA}	*(16,17)	4,59 ^{bA}	64,35 ^{aB}	*** (8,43)							
BR1	3,65 ^{BDC}	43,83 ^{BA}	nz(10,36)	4,60 ^{bA}	54,76 ^{aCB}	** (4,60)							
BR2	4,91 ^{bBDAC}	30,24 ^{aBA}	*(4,83)	2,59 ^{bBC}	49,05 ^{aCBD}	*(5,66)							
BR3	7,11 ^{bA}	45,14 ^{aA}	** (1,19)	2,10 ^{bC}	28,33 ^{aCD}	*(4,21)							
LB1	2,94 ^{bBDC}	33,92 ^{aBA}	*** (0,94)	2,48 ^{BC}	96,7 ^A	nz(26,27)							
LB2	4,13 ^{bBDAC}	46,97 ^{aA}	*(7,42)	3,44 ^{BAC}	27,42 ^{CD}	nz(9,31)							
LB3	5,56 ^{BAC}	24,10 ^{BA}	nz(11,98)	3,98 ^{bBAC}	36,26 ^{aCBD}	** (1,35)							
LB4	2,47 ^{bDC}	16,81 ^{aBA}	** (1,39)	3,19 ^{bBAC}	27,10 ^{aCD}	*(3,82)							
LB5	4,99 ^{BDAC}	12,53 ^B	nz(4,54)	2,22 ^{bC}	27,65 ^{aCD}	** (3,33)							
LB6	-	24,77 ^{BA}	-	-	33,38 ^{CB}	-							
ROŽ1	2,63 ^{bBDC}	29,22 ^{aBA}	*(6,11)	4,23 ^{bBA}	20,24 ^{aD}	*(1,89)							
ROŽ2	5,19 ^{BDAC}	48,23 ^A	nz(11,84)	2,84 ^{BAC}	59,96 ^B	nz(17,62)							
ROŽ3	2,90 ^{bBDC}	42,53 ^{aBA}	*(8,43)	2,32 ^{bC}	41,31 ^{aCBD}	*(6,86)							
ROŽ4	1,88 ^{bD}	18,62 ^{aBA}	*(3,73)	2,87 ^{bBAC}	35,62 ^{aCBD}	*(4,43)							
$p_R(\text{SEM})$	*** (0,90)	** (10,20)	*(0,66)	** (12,44)									

kontrola – dodan samo nosilec (sol, škrob) brez ekstrakta; BR1 – brinove jagode (Volče, 550 m n.m.v.), BR2 – brinove jagode (Vremščica, 1000 m n.m.v.), BR3 – brinove jagode (kupljene), LB1 – lubje črnega bora (območje Kopera), LB2 – lubje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB3 – lubje črnega bora (Volče, 550 m n.m.v.), LB4 – lubje rdečega bora, LB5 – lubje zelenega bora, LB6 – lubje pinje (območje kopra), ROŽ1 – svež rožmarin (domač), ROŽ2 – suh rožmarin (Kotanyi), ROŽ3 – suh rožmarin (Maestro), ROŽ4 – svež rožmarin (območje Kopera); značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; p_N – statistična verjetnost vpliva nosilca; p_R – statistična značilnost vpliva dodatka rastlinskega ekstrakta; SEM, standardna napaka povprečja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med soljo ali škrobom kot nosilcem rastlinskega ekstrakta); srednje vrednosti z različno črko (^{A,B,C,D,E,F,G}) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo (značilnost razlik med različnimi dodanimi rastlinskimi ekstrakti).

control - carrier (salt, starch) without extracts; BR1 – juniper berries (Volče, 550 m n.m.v.), BR2 – juniper berries (Vremščica, 1000 m n.m.v.), BR3 – juniper berries, LB1 – black pine bark (Koper), LB2 – black pine bark (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB3 – black pine bark

(Volče, 550 m n.m.v.), LB4 – red pine bark, LB5 – green black pine bark, LB6 – pinus bark (Koper), ROŽ1 – fresh rosemary (home), ROŽ2 – dry rosemary (Kotanyi), ROŽ3 – dry rosemary (Maestro), ROŽ4 – fresh rosemary (Koper); levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; p_N , statistical probability of carrier of plant extracts; p_R , statistical probability of addition of different plant extracts; SEM, standard error of mean; means with a different superscript within columns (^{a, b}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between salt and starch carriers); means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D, E, F, G}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different plant extracts).

Priloga B.4: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n-3*–obogatitev) na vsebnost ($\mu\text{g}/\text{kg}$) posameznih in skupnih HAA v pečenih piščančjih sekljancih z dodanimi različnimi rastlinskimi ekstrakti, vezanimi na sol in škrob

Annex B.4: Effect of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n-3* enriched) on content ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of individual and total HAA of roasted chicken patties, prepared with addition of different plant extract bounded on salt or starch

Nosilec	škrob		sol		škrob		sol		
obogatitev	običajen	<i>n-3</i>	$p_E(\text{SEM})$	običajen	<i>n-3</i>	$p_E(\text{SEM})$	običajen	<i>n-3</i>	$p_E(\text{SEM})$
ekstrakt	MeIQ				MeIQx				
kontrola	0,70	0,29	nz(0,30)	0,02	0,00	nz(0,02)	0,31	0,27	nz(0,17)
BR1	0,34	0,62	nz(0,06)	1,16	0,93	nz(0,36)	-	-	-
BR2	0,59 ^a	0,46 ^b	*(0,02)	0,77	1,02	nz(0,15)	0,28	0,72	nz(0,12)
BR3	0,94 ^a	0,16 ^b	** (0,03)	1,10	0,87	nz(0,35)	0,64 ^a	0,28 ^b	*(0,06)
LB1	0,32	0,33	nz(0,05)	0,81	1,82	nz(0,44)	0,17	0,41	nz(0,13)
LB2	0,37	0,40	nz(0,09)	0,52	1,24	nz(0,64)	1,18	1,32	nz(0,17)
LB3	0,84	0,37	nz(0,11)	0,53	0,50	nz(0,06)	1,27	0,90	nz(0,24)
LB4	0,24	0,33	nz(0,08)	0,31	0,87	nz(0,17)	1,55	0,95	nz(0,45)
LB5	0,49 ^a	0,20 ^b	*(0,12)	0,28	0,31	nz(0,13)	1,19 ^b	2,47 ^a	*(0,60)
LB6	-	-	-	0,53	0,16	nz(0,28)	1,18	1,32	nz(0,17)
ROŽ1	0,28	0,72	nz(0,12)	0,30	0,00	nz(0,30)	1,27	0,90	nz(0,24)
ROŽ2	0,64 ^a	0,28 ^b	*(0,06)	1,23	0,83	nz(0,28)	1,55	0,95	nz(0,45)
ROŽ3	0,31	0,27	nz(0,17)	0,64	0,61	nz(0,19)	1,19 ^b	2,47 ^a	*(0,60)
ROŽ4	0,17	0,41	nz(0,13)	0,43 ^b	0,96 ^a	*(0,09)	0,72	1,05	nz(0,21)
	PhIP				Harman				
kontrola	3,22	1,37	nz(1,43)	29,32 ^b	55,74 ^a	*(14,23)	0,08	0,07	nz(0,02)
BR1	1,48	1,67	nz(0,36)	23,57	30,02	nz(10,26)	0,08	0,14	nz(0,02)
BR2	2,08 ^a	0,65 ^b	*(0,23)	17,84	28,58	nz(4,59)	0,11 ^a	0,10 ^b	*(0,01)
BR3	3,07 ^a	0,57 ^b	*** (0,02)	27,24	19,16	nz(3,30)	0,20 ^a	0,04 ^b	** (0,01)
LB1	1,32	0,58	nz(0,17)	26,90	69,20	nz(19,07)	0,04	0,05	nz(0,02)
LB2	1,73	1,32	nz(0,11)	35,13	18,24	nz(5,88)	0,08	0,09	nz(0,01)
LB3	2,60	1,63	nz(0,34)	18,74	28,91	nz(9,49)	0,16	0,08	nz(0,02)
LB4	1,03	1,31	nz(0,35)	12,23	20,34	nz(3,17)	0,04	0,05	nz(0,01)
LB5	2,27 ^a	0,89 ^b	** (0,40)	9,49	22,09	nz(6,59)	0,12	0,04	nz(0,04)
LB6	-	-	-	19,16	27,34	nz(6,03)	-	-	-
ROŽ1	0,90	1,42	nz(0,28)	21,72	17,04	nz(3,11)	0,06	0,13	nz(0,03)
ROŽ2	2,09	1,33	nz(0,27)	36,69	45,61	nz(15,12)	0,11 ^a	0,06 ^b	*(0,01)
ROŽ3	1,30	0,76	nz(0,74)	33,29	31,34	nz(7,51)	0,06	0,06	nz(0,03)
ROŽ4	0,78	0,95	nz(0,23)	11,83	26,04	nz(3,89)	0,03 ^b	0,06 ^a	*(0,00)
	Norharman				4,8-DiMeIQ				
kontrola	0,18	0,08	nz(0,07)	0,22	0,20	nz(0,14)	0,04 ^a	0,02 ^b	*(0,02)
BR1	0,15	0,23	nz(0,03)	1,91	2,35	nz(0,33)	0,02	0,03	nz(0,00)
BR2	0,20 ^a	0,14 ^b	** (0,01)	1,29	2,29	nz(0,41)	0,02	0,02	nz(0,01)
BR3	0,35 ^a	0,08 ^b	** (0,02)	2,13 ^a	1,42 ^b	*(0,16)	0,01 ^a	0,01 ^b	** (0,02)
LB1	0,10	0,09	nz(0,02)	1,72	5,00	nz(1,50)	0,02	0,01	nz(0,00)
LB2	0,15	0,16	nz(0,01)	2,22	1,25	nz(0,34)	0,03	0,02	nz(0,00)
LB3	0,23	0,15	nz(0,03)	1,05	1,74	nz(0,45)	0,00 ^b	0,02 ^b	*** (0,00)
LB4	0,09	0,11	nz(0,03)	0,90	1,26	nz(0,13)	0,02	0,02	nz(0,00)
LB5	0,25 ^a	0,09 ^b	*(0,07)	0,68	1,28	nz(0,28)	0,02	0,01	nz(0,01)
LB6	-	-	-	1,11	1,44	nz(0,23)	-	-	-
ROŽ1	0,11	0,22	nz(0,03)	1,37	1,38	nz(0,28)	0,02	0,03	nz(0,00)
ROŽ2	0,24 ^a	0,11 ^b	*(0,02)	2,16	2,98	nz(1,16)	0,02	0,02	nz(0,00)
ROŽ3	0,13	0,11	nz(0,07)	2,13	2,02	nz(0,63)	0,02	0,02	nz(0,00)
ROŽ4	0,08	0,13	nz(0,02)	0,89	1,70	nz(0,36)	0,02	0,02	nz(0,00)
	7,8-DiMeIQ				Glu-P-2				
kontrola	0,03 ^a	0,02 ^b	*(0,00)	0,01	0,03	nz(0,02)	0,13	0,04	nz(0,08)
BR1	0,02	0,03	nz(0,00)	1,08	1,00	nz(0,03)	0,10	0,08	nz(0,01)
BR2	0,03	0,02	nz(0,00)	0,70	0,65	nz(0,20)	0,15 ^{ab}	0,05	** (0,01)
BR3	0,02 ^a	0,02 ^b	*(0,00)	0,76	0,99	nz(0,07)	0,20 ^a	0,04 ^b	** (0,01)
LB1	0,02	0,01	nz(0,00)	0,28	1,17	nz(0,41)	0,05 ^a	0,04 ^b	** (0,01)
BR1	0,02	0,03	nz(0,00)	1,08	1,00	nz(0,03)	0,10	0,08	nz(0,01)

Se nadaljuje.

Nadaljevanje priloge B.4: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (n-3 obogatitev) na vsebnost ($\mu\text{g}/\text{kg}$) posameznih in skupnih HAA pečenih piščančjih sekljancih z dodanimi različnimi rastlinskimi ekstrakti, vezanimi na sol in škrob

Continuation of annex B.4: Effect of ground whole flaxseed addition in chicken feed (n-3 enriched) on content ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of individual and total HAA of roasted chicken patties, prepared with addition of different plant extract bounded on salt or starch

Nosilec obogatitev ekstrakt	škrob			sol			škrob			sol		
	običajen	n-3	$p_E(\text{SEM})$	običajen	n-3	$p_E(\text{SEM})$	običajen	n-3	$p_E(\text{SEM})$	običajen	n-3	$p_E(\text{SEM})$
	7,8-DiMeIQ						Glu-P-2					
LB2	0,04	0,02	nz(0,00)	0,77	0,70	nz(0,16)	0,17	0,05	nz(0,02)	0,19	0,24	nz(0,21)
LB3	0,02	0,02	nz(0,00)	0,56	0,60	nz(0,16)	0,14	0,08	nz(0,03)	0,30	0,49	nz(0,19)
LB4	0,02	0,02	nz(0,00)	0,41	0,41	nz(0,06)	0,03	0,05	nz(0,02)	0,28	0,42	nz(0,08)
LB5	0,02	0,02	nz(0,01)	0,24	0,45	nz(0,09)	0,11	0,03	nz(0,04)	0,15	0,40	nz(0,08)
LB6	-	-	-	0,61	0,62	nz(0,23)	-	-	-	0,37 ^b	0,60 ^a	*(0,04)
ROŽ1	0,02	0,03	nz(0,00)	0,43	0,26	nz(0,25)	0,10	0,07	nz(0,03)	0,15	0,03	nz(0,08)
ROŽ2	0,02	0,02	nz(0,00)	0,56 ^a	0,49 ^b	*(0,02)	0,14 ^a	0,07 ^b	*(0,02)	0,45	0,68	nz(0,18)
ROŽ3	0,02	0,01	nz(0,00)	0,78	0,50	nz(0,30)	0,06	0,04	nz(0,03)	0,54	0,60	nz(0,16)
ROŽ4	0,02	0,02	nz(0,00)	0,42	0,49	nz(0,08)	0,03	0,04	nz(0,02)	0,25	0,39	nz(0,10)
	IQ						IQx					
kontrola	0,01	0,01	nz(0,00)	0,26 ^b	0,89 ^a	** (0,29)	0,37 ^a	0,21 ^b	*** (0,04)	2,33	3,27	nz(0,74)
BR1	0,00 ^b	0,02 ^a	*(0,00)	0,00	0,02	nz(0,01)	0,26	0,47	nz(0,08)	0,00	0,08	nz(0,08)
BR2	0,03	0,01	nz(0,01)	0,00	0,02	nz(0,02)	0,43	0,25	nz(0,04)	0,00	0,00	-
BR3	0,01	0,03	nz(0,02)	0,00	0,01	nz(0,00)	0,73 ^a	0,21 ^b	*** (0,01)	0,14	0,04	*(0,01)
LB1	0,01	0,01	nz(0,00)	0,01	0,03	nz(0,01)	0,34 ^a	0,32 ^b	*(0,09)	0,04	0,29	nz(0,10)
LB2	0,01 ^a	0,01 ^b	*(0,02)	0,01	0,00	nz(0,01)	0,30	0,37	nz(0,04)	0,11	0,06	nz(0,06)
LB3	0,01	0,01	nz(0,00)	0,00	0,00	-	0,60	0,30	nz(0,09)	0,00	0,00	-
LB4	0,01	0,01	nz(0,00)	0,00	0,00	-	0,28	0,37	nz(0,07)	0,00	0,00	-
LB5	0,04	0,01	nz(0,03)	0,00	0,02	nz(0,02)	0,42	0,22	*(0,01)	0,00	0,00	-
LB6	-	-	-	0,00	0,00	-	-	-	-	0,00	0,00	-
ROŽ1	0,00	0,01	nz(0,06)	0,00	0,00	nz(0,00)	0,27	0,35	nz(0,00)	0,06	0,01	nz(0,03)
ROŽ2	0,05	0,01	nz(0,00)	0,01	0,00	nz(0,01)	0,54	0,23	nz(0,09)	0,16	0,00	nz(0,04)
ROŽ3	0,01	0,01	nz(0,00)	0,00	0,00	-	0,26	0,33	nz(0,10)	0,00	0,00	-
ROŽ4	0,01	0,01	nz(0,04)	0,00	0,00	nz(0,00)	0,23	0,30	nz(0,08)	0,04	0,05	nz(0,01)
	AaC						skupni HAA					
kontrola	0,02	0,01	nz(0,00)				5,97	4,60	nz(2,34)	34,70 ^b	64,35 ^a	*(16,40)
BR1	0,01	0,02	nz(0,00)				3,66	4,61	nz(0,62)	43,84	54,76	nz(11,32)
BR2	0,02	0,01	nz(0,00)				4,91 ^a	2,60 ^b	** (0,12)	30,25	49,05	nz(7,44)
BR3	0,04 ^a	0,01 ^b	** (0,00)				7,11 ^a	2,10 ^b	** (0,44)	45,14	28,33	nz(4,35)
LB1	0,01	0,01	nz(0,00)				2,94	2,49	nz(0,58)	33,93	96,70	nz(26,29)
LB2	0,01	0,02	nz(0,00)				4,13	3,44	nz(0,39)	46,98	27,42	nz(11,89)
LB3	0,02	0,01	nz(0,00)				5,56	3,99	*(0,42)	24,10	36,26	nz(12,04)
LB4	0,01	0,01	nz(0,00)				2,47	3,20	nz(0,71)	16,82	27,10	nz(4,01)
LB5	0,02 ^a	0,00 ^b	** (0,01)				4,99 ^a	2,22 ^b	** (0,62)	12,53	27,65	nz(7,55)
LB6	-	-	-				-	-	-	24,77	33,38	nz(7,13)
ROŽ1	0,01	0,02	nz(0,00)				2,63	4,24	nz(0,81)	29,23	20,24	nz(6,35)
ROŽ2	0,02	0,01	nz(0,00)				5,19 ^a	2,84 ^b	*(0,53)	48,23	59,96	nz(21,23)
ROŽ3	0,01	0,01	nz(0,00)				2,90	2,33	nz(1,49)	42,54	41,31	nz(10,77)
ROŽ4	0,01	0,01	nz(0,00)				1,89	2,87	nz(0,67)	18,63	35,62	nz(5,75)

kontrola – dodan samo nosilec (sol, škrob) brez ekstrakta; BR1 – brinove jagode (Volče, 550 m n.m.v.), BR2 – brinove jagode (Vremščica, 1000 m n.m.v.), BR3 – brinove jagode (kupljene), LB1 – lubje črnega bora (območje Koper), LB2 – lubje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB3 – lubje črnega bora (Volče, 550 m n.m.v.), LB4 – lubje rdečega bora, LB5 – lubje zelenega bora, LB6 – lubje pinje (območje Koper), ROŽ1 – svež rožmarin (domač), ROŽ2 – suh rožmarin (Kotanyi), ROŽ3 – suh rožmarin (Maestro), ROŽ4 – svež rožmarin (območje Koper); značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; p_E – statistična verjetnost vpliva obogatitve prehrane z n-3 VNMK; SEM, standardna napaka povprečja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in n-3-obogatenimi piščančjimi sekljanci).

control - carrier (salt, starch) without extracts; BR1 – juniper berries (Volče, 550 m n.m.v.), BR2 – juniper berries (Vremščica, 1000 m n.m.v.), BR3 – juniper berries, LB1 – black pine bark (Koper), LB2 – black pine bark (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB3 – black pine bark (Volče, 550 m n.m.v.), LB4 – red pine bark, LB5 – green black pine bark, LB6 – pinus bark (Koper), ROŽ1 – fresh rosemary (home), ROŽ2 – dry rosemary (Kotanyi), ROŽ3 – dry rosemary (Maestro), ROŽ4 – fresh rosemary (Koper); levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz – $p > 0,05$ statistically not significant; p_E , statistical probability of enrichment effect; SEM, standard error of mean; means with a different superscript within columns (^{a,b}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between control and n-3-enriched patties).

Priloga B.5: Vpliv dodatka različnih rastlinskih ekstraktov in nosilcev teh ekstraktov na izgubo (%) mase med toplotno obdelavo piščančjih sekljancev

Annex B.5: Effects of different plant extract addition and used carriers of those extracts on weight loss (%) of chicken patties during thermal treatment

Obogatitev nosilec ekstrakt	običajen			n-3		
	škrob	sol	$p_N(\text{SEM})$	škrob	sol	$p_N(\text{SEM})$
kontrola	16 ^b	23 ^{aDE}	* (3)	15 ^{bF}	31 ^{aAB}	** (4)
BR1	19	30 ^{ABC}	nz(3)	24 ^{AB}	29 ^{ABC}	nz(1)
BR3	24 ^b	32 ^{aAB}	* (1)	22 ^{bBC}	27 ^{aABCD}	** (1)
BR4	22 ^b	33 ^{aA}	** (1)	20 ^{bCDE}	26 ^{aABCD}	* (1)
LB1	21 ^b	28 ^{aABCD}	* (1)	22 ^{CD}	27 ^{ABCD}	nz(4)
LB2	23 ^b	34 ^{aA}	* (2)	22 ^{BC}	29 ^{ABC}	nz(2)
LB3	21 ^b	26 ^{aCD}	* (1)	18 ^E	25 ^{ABCD}	nz(2)
LB4	22 ^b	25 ^{aCDE}	* (1)	19 ^E	23 ^{CD}	nz(1)
LB5	22	21 ^E	nz(4)	20 ^{DE}	22 ^{CD}	nz(2)
LB6	-	27 ^{BCD}	-	-	21 ^D	-
ROŽ1	21	30 ^{ABC}	nz(2)	25 ^A	29 ^{ABC}	nz(1)
ROŽ2	18 ^b	30 ^{aABC}	** (2)	20 ^{bCDE}	27 ^{aABCD}	* (1)
ROŽ3	-	26 ^{CDE}	nz(2)	-	24 ^{BCD}	-
ROŽ4	20 ^b	29 ^{aABC}	* (2)	21 ^{bCD}	31 ^{aA}	* (3)
$p_R(\text{SEM})$	nz(2)	*** (2)		*** (1)	*** (2)	

kontrola – dodan samo nosilec (sol, škrob) brez ekstrakta; BR1 – brinove jagode (Volče, 550 m n.m.v.), BR2 – brinove jagode (Vremščica, 1000 m n.m.v.), BR3 – brinove jagode (kupljene), LB1 – lubje črnega bora (območje Koper), LB2 – lubje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB3 – lubje črnega bora (Volče, 550 m n.m.v.), LB4 – lubje rdečega bora, LB5 – lubje zelenega bora, LB6 – lubje pinje (območje Koper), ROŽ1 – svež rožmarin (domač), ROŽ2 – suh rožmarin (Kotanyi), ROŽ3 – suh rožmarin (Maestro), ROŽ4 – svež rožmarin (območje Koper); značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; p_N – statistična verjetnost vpliva nosilca; p_R – statistična značilnost vpliva dodatka rastlinskega ekstrakta; SEM, standardna napaka povprečja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med soljo ali škrobom kot nosilcem rastlinskega ekstrakta); vrednosti z različno nadpisano črko (^{A,B,C,D,E}) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo (značilnost razlik med različnimi dodanimi rastlinskimi ekstrakti).

control - carrier (salt, starch) without extracts; BR1 – juniper berries (Volče, 550 m n.m.v.), BR2 – juniper berries (Vremščica, 1000 m n.m.v.), BR3 – juniper berries, LB1 – black pine bark (Koper), LB2 – black pine bark (Vremščica, 1000 m n.m.v.), LB3 – black pine bark (Volče, 550 m n.m.v.), LB4 – red pine bark, LB5 – green black pine bark, LB6 – pinus bark (Koper), ROŽ1 – fresh rosemary (home), ROŽ2 – dry rosemary (Kotanyi), ROŽ3 – dry rosemary (Maestro), ROŽ4 – fresh rosemary (Koper); levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; p_N , statistical probability of carrier of plant extracts; p_R , statistical probability of addition of different plant extracts; SEM, standard error of mean; means with a different superscript within columns (^{a,b}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between salt and starch carriers); means with a different superscript within rows (^{A,B,C,D,E}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different plant extracts).

Priloga C: Sklop III: Marinade z ekstraktom brinovih jagod in njihov vpliv na tvorbo produktov oksidacije in HAA v piščančjih mini filejih, obogatenih z *n*-3 VNMK

Annex C: Part III: Marinades with an juniper berries extract and their influence on the formation of oxidation products and HAA in chicken inner fillets, *n*-3-enriched

Priloga C.1: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3-obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi 4 (±1) °C in v modificirani atmosferi na instrumentalno izmerjeno barvo mariniranih presnih piščančjih mini filejev

Annex C.1: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3-enriched) and storage time at temperature at 4 (±1) °C and in modified atmosphere on instrumental colour values of raw marinated chicken inner fillets

Nosilec ekstrakta	vrednost	TO			IR			pečica			žar		
		dan	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)		
kontrola	<i>L</i> *	1	52,25 ^b	54,19	nz(3,18)	52,25 ^b	54,19	nz(3,18)	52,25 ^b	54,19	nz(3,18)		
		5	54,25 ^{ab}	51,85	nz(1,70)	54,25 ^{ab}	51,85	nz(1,70)	54,25 ^{ab}	51,85	nz(1,70)		
		9	56,98 ^a	54,56	nz(4,55)	56,98 ^a	54,56	nz(4,55)	56,98 ^a	54,56	nz(4,55)		
		<i>p_D</i> (SEM)	*(1,85)	nz(4,36)	*(1,85)	nz(4,36)	*(1,85)	nz(4,36)					
	<i>a</i> *	1	1,75	0,91 ^b	nz(0,73)	1,75	0,91 ^b	nz(0,73)	1,75	0,91 ^b	nz(0,73)		
		5	1,20 ^B	2,74 ^{aA}	*(0,63)	1,20 ^B	2,74 ^{aA}	*(0,63)	1,20 ^B	2,74 ^{aA}	*(0,63)		
		9	0,96 ^B	2,57 ^{aA}	** (0,56)	0,96 ^B	2,57 ^{aA}	** (0,56)	0,96 ^B	2,57 ^{aA}	** (0,56)		
		<i>p_D</i> (SEM)	nz(0,74)	** (0,53)	nz(0,74)	** (0,53)	nz(0,74)	** (0,53)					
	<i>b</i> *	1	5,97	5,75	nz(0,10)	5,97	5,75	nz(0,10)	5,97	5,75	nz(0,10)		
		5	6,48	6,78	nz(1,01)	6,48	6,78	nz(1,01)	6,48	6,78	nz(1,01)		
		9	7,86	8,02	nz(2,24)	7,86	8,02	nz(2,24)	7,86	8,02	nz(2,24)		
		<i>p_D</i> (SEM)	nz(1,51)	nz(1,81)	nz(1,51)	nz(1,81)	nz(1,51)	nz(1,81)					
olje	<i>L</i> *	1	52,55	53,84	nz(2,27)	52,55	53,84	nz(2,27)	52,55	53,84	nz(2,27)		
		5	56,21	53,69	nz(1,62)	56,21	53,69	nz(1,62)	56,21	53,69	nz(1,62)		
		9	53,39	51,65	nz(4,29)	53,39	51,65	nz(4,29)	53,39	51,65	nz(4,29)		
		<i>p_D</i> (SEM)	nz(2,22)	nz(3,53)	nz(2,22)	nz(3,53)	nz(2,22)	nz(3,53)					
	<i>a</i> *	1	1,12 ^B	1,22 ^A	nz(0,18)	1,12 ^B	1,22 ^A	nz(0,18)	1,12 ^B	1,22 ^A	nz(0,18)		
		5	1,38	1,95	nz(1,65)	1,38	1,95	nz(1,65)	1,38	1,95	nz(1,65)		
		9	1,32	1,30	nz(0,93)	1,32	1,30	nz(0,93)	1,32	1,30	nz(0,93)		
		<i>p_D</i> (SEM)	nz(0,98)	nz(1,21)	nz(0,98)	nz(1,21)	nz(0,98)	nz(1,21)					
	<i>b</i> *	1	4,27 ^{bb}	6,58 ^A	*(0,96)	4,27 ^{bb}	6,58 ^A	*(0,96)	4,27 ^{bb}	6,58 ^A	*(0,96)		
		5	6,09 ^a	7,27	nz(0,96)	6,09 ^a	7,27	nz(0,96)	6,09 ^a	7,27	nz(0,96)		
		9	6,63 ^a	6,67	nz(0,90)	6,63 ^a	6,67	nz(0,90)	6,63 ^a	6,67	nz(0,90)		
		<i>p_D</i> (SEM)	*(0,93)	nz(0,95)	*(0,93)	nz(0,95)	*(0,93)	nz(0,95)					
škrob	<i>L</i> *	1	52,68 ^A	47,8 ^{bb}	*(2,77)	52,68 ^A	47,8 ^{bb}	*(2,77)	52,68 ^A	47,8 ^{bb}	*(2,77)		
		5	56,54	55,52 ^a	nz(2,35)	56,54	55,52 ^a	nz(2,35)	56,54	55,52 ^a	nz(2,35)		
		9	55,87 ^A	49,94 ^{bb}	*(2,43)	55,87 ^A	49,94 ^{bb}	*(2,43)	55,87 ^A	49,94 ^{bb}	*(2,43)		
		<i>p_D</i> (SEM)	nz(2,58)	** (2,47)	nz(2,58)	** (2,47)	nz(2,58)	** (2,47)					
	<i>a</i> *	1	0,01 ^B	2,10 ^{aA}	** (0,56)	0,01 ^B	2,10 ^{aA}	** (0,56)	0,01 ^B	2,10 ^{aA}	** (0,56)		
		5	0,03 ^B	2,00 ^{aA}	*** (0,21)	0,03 ^B	2,00 ^{aA}	*** (0,21)	0,03 ^B	2,00 ^{aA}	*** (0,21)		
		9	0,37	0,63 ^b	nz(0,84)	0,37	0,63 ^b	nz(0,84)	0,37	0,63 ^b	nz(0,84)		
		<i>p_D</i> (SEM)	nz(0,59)	*(0,60)	nz(0,59)	*(0,60)	nz(0,59)	*(0,60)					
	<i>b</i> *	1	4,05	5,09 ^b	nz(1,00)	4,05	5,09 ^b	nz(1,00)	4,05	5,09 ^b	nz(1,00)		
		5	6,91	8,29 ^a	nz(1,58)	6,91	8,29 ^a	nz(1,58)	6,91	8,29 ^a	nz(1,58)		
		9	4,97	7,24 ^{ab}	nz(2,19)	4,97	7,24 ^{ab}	nz(2,19)	4,97	7,24 ^{ab}	nz(2,19)		
		<i>p_D</i> (SEM)	nz(1,82)	*(1,49)	nz(1,82)	*(1,49)	nz(1,82)	*(1,49)					
sol	<i>L</i> *	1	54,08	51,76	nz(2,66)	54,08	51,76	nz(2,66)	54,08	51,76	nz(2,66)		
		5	55,54	54,29	nz(1,44)	55,54	54,29	nz(1,44)	55,54	54,29	nz(1,44)		
		9	56,34	52,24	nz(2,96)	56,34	52,24	nz(2,96)	56,34	52,24	nz(2,96)		
		<i>p_D</i> (SEM)	nz(3,04)	nz(1,64)	nz(3,04)	nz(1,64)	nz(3,04)	nz(1,64)					
	<i>a</i> *	1	0,96 ^b	1,72 ^a	nz(0,55)	0,96 ^b	1,72 ^a	nz(0,55)	0,96 ^b	1,72 ^a	nz(0,55)		
		5	2,20 ^a	2,16 ^a	nz(1,08)	2,20 ^a	2,16 ^a	nz(1,08)	2,20 ^a	2,16 ^a	nz(1,08)		
		9	0,73 ^b	0,20 ^b	nz(0,52)	0,73 ^b	0,20 ^b	nz(0,52)	0,73 ^b	0,20 ^b	nz(0,52)		
		<i>p_D</i> (SEM)	*(0,67)	*(0,84)	*(0,67)	*(0,84)	*(0,67)	*(0,84)					
	<i>b</i> *	1	4,13 ^b	5,53 ^b	nz(1,66)	4,13 ^b	5,53 ^b	nz(1,66)	4,13 ^b	5,53 ^b	nz(1,66)		
		5	8,50 ^a	8,14 ^a	nz(1,28)	8,50 ^a	8,14 ^a	nz(1,28)	8,50 ^a	8,14 ^a	nz(1,28)		
		9	6,81 ^a	7,85 ^a	nz(1,30)	6,81 ^a	7,85 ^a	nz(1,30)	6,81 ^a	7,85 ^a	nz(1,30)		
		<i>p_D</i> (SEM)	*(1,58)	*(1,25)	*(1,58)	*(1,25)	*(1,58)	*(1,25)					

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, $nz - p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_E , statistična verjetnost vpliva $n-3$ -obogatitja krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in $n-3$ -obogatenimi mini fileji); p_D , statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b, c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

without - carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, $nz - p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_E , statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A, B}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between control and $n-3$ -enriched chicken inner fillets); p_D , statistical probability of storage time effect; means with a different superscript within columns (^{a, b, c}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between times of storage)

Priloga C.2: Vpliv različnih nosilcev (kontrola, olje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na instrumentalno izmerjeno barvo pri običajnih in $n-3$ -obogatenih mariniranih presnih mini filejih, pakiranih v modificirani atmosferi, med devetdnevnim skladiščenjem pri temperaturi (4 ± 1) °C

Annex C.2: Effect of different juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on instrumental colour values of marinated raw chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed ($n-3$ enriched) and without (control), during 9 days of storing at temperature of (4 ± 1) °C and in modified atmosphere

Dan parameter	Obogatitev običajen					n-3					
	Nosilec	kontrola	olje	škrob	sol	p_N (SEM)	kontrola	olje	škrob	sol	p_N (SEM)
1	L^*	52,25	52,55	52,68	54,08	nz(2,35)	54,19 ^A	53,84 ^A	47,81 ^B	51,76 ^{AB}	*(3,08)
	a^*	1,75 ^A	1,12 ^{AB}	0,01 ^C	0,96 ^B	** (0,45)	0,91	1,22	2,10	1,72	nz(0,63)
	b^*	5,97	4,27	4,05	4,13	nz(1,37)	5,75	6,58	5,09	5,53	nz(1,27)
5	L^*	54,25	56,21	56,54	55,54	nz(1,63)	51,85	53,69	55,52	54,29	nz(1,97)
	a^*	1,20 ^{AB}	1,38 ^{AB}	0,03 ^B	2,20 ^A	*(0,85)	2,74	1,95	2,00	2,16	nz(1,19)
	b^*	6,48 ^B	6,09 ^B	6,91 ^{AB}	8,50 ^A	*(1,12)	6,78	7,27	8,29	8,14	nz(1,33)
9	L^*	56,98	53,39	55,87	56,34	nz(3,16)	54,56	51,65	49,94	52,24	nz(4,11)
	a^*	0,96	1,32	0,37	0,73	nz(0,89)	2,57 ^A	1,30 ^B	0,63 ^{BC}	0,20 ^C	*** (0,53)
	b^*	7,86	6,63	4,97	6,81	nz(1,89)	8,02	6,67	7,24	7,85	nz(1,61)

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, $nz - p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_N , statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod)

without - carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, $nz - p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_N , statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different juniper berries extract carriers)

Priloga C.3: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n-3*-obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C na parameter oksidacije lipidov (TBK) v mariniranih piščančjih mini filejih, pakiranih v modificirano atmosfero, pečenih na dvoploščnem žaru, v pečici in pečici IR
Annex C.3: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n-3* enriched) and storage time at temperature of (4 ± 1) °C on lipid oxidation parameter (TBARs) of marinated chicken inner fillets, packed in modified atmosphere, after thermal treatment on two-plated grill, oven and IR oven

Nosilec	TO			IR			pečica		žar	
	dan/obogatitev	običajen	<i>n-3</i>	p_E (SEM)	običajen	<i>n-3</i>	p_E (SEM)	običajen	<i>n-3</i>	p_E (SEM)
kontrola	1	0,26 ^B	0,40 ^{Ab}	** (0,02)	0,38 ^{Ab}	0,29 ^{Bb}	* (0,01)	0,39 ^A	0,33 ^B	** (0,00)
	5	0,46	0,28 ^c	nz(0,03)	0,66 ^a	0,40 ^a	nz(0,07)	2,84	0,47	nz(2,36)
	9	0,42	1,42 ^a	** (0,05)	0,37 ^b	0,45 ^a	nz(0,03)	0,19 ^B	0,36 ^A	** (0,01)
	p_D (SEM)	nz(0,18)	*** (0,03)	** (0,06)	** (0,03)	nz(1,93)	nz(0,06)			
olje	1	0,38 ^{Bb}	0,84 ^{Bb}	* (0,05)	0,44 ^b	0,60 ^b	* (0,02)	0,21 ^b	0,30 ^b	nz(0,03)
	5	0,47 ^{Ba}	1,54 ^{Aa}	* (0,12)	0,28 ^{Bb}	0,52 ^{Ab}	nz(0,14)	0,38 ^a	0,48 ^a	nz(0,03)
	9	0,35 ^b	0,35 ^c	nz(0,02)	1,30 ^a	1,52 ^a	nz(0,05)	0,31 ^{Aa}	0,27 ^{Bb}	* (0,00)
	p_D (SEM)	* (0,03)	** (0,10)	** (0,07)	** (0,11)	* (0,03)	** (0,03)			
škrob	1	0,36 ^a	0,32	nz(0,03)	0,24 ^b	0,37 ^a	nz(0,03)	0,20	0,19 ^b	nz(0,03)
	5	0,22 ^b	0,27	nz(0,02)	0,22 ^b	0,26 ^b	nz(0,02)	0,41	0,37 ^a	nz(0,07)
	9	0,34 ^{Aa}	0,26 ^B	* (0,02)	0,41 ^a	0,40 ^a	nz(0,03)	0,33	0,32 ^a	nz(0,03)
	p_D (SEM)	* (0,02)	nz(0,02)	* (0,03)	* (0,03)	nz(0,06)	(0,03)			
sol	1	0,40 ^{Aa}	0,24 ^{Bb}	* (0,03)	0,85 ^{Aa}	0,25 ^{Bc}	*** (0,02)	0,15 ^b	0,17 ^b	nz(0,01)
	5	0,19 ^b	0,22 ^b	nz(0,02)	0,36 ^b	0,30 ^b	nz(0,05)	0,37 ^a	0,39 ^a	nz(0,03)
	9	0,48 ^a	0,53 ^a	nz(0,05)	0,39 ^b	0,31 ^a	nz(0,04)	0,33 ^a	0,34 ^a	nz(0,02)
	p_D (SEM)	** (0,03)	(0,05)	** (0,05)	*** (0,00)	** (0,03)	* (0,02)			

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_E , statistična verjetnost vpliva *n-3*-obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n-3*-obogatenimi mini fileji); p_D , statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

without - carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_E , statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A,B}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between control and *n-3*-enriched inner fillets); p_D , statistical probability of storage time effect; means with a different superscript within columns (^{a,b,c}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between times of storage)

Priloga C.4: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, v pečici in pečici IR) in nosilca (kontrola, olje, škrob in sol) ekstrakta brinovih jagod na parameter oksidacije lipidov (TBK) običajnih in *n*-3-obogatenih mariniranih mini filejih, pakiranih v modificirani atmosferi, med devetdnevnim skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C

Annex C.4: Effects of type of thermal treatment (two-platted grill, oven and IR oven) and juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on instrumental colour values, lipid oxidation parameter (TBARS) after thermal treatment of marinated chicken inner filets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n*-3 enriched) and without (control), during 9-day storage in modified atmosphere and at temperature of (4 ±1) °C

dan	način TO/nosilec	običajen				$p_N(\text{SEM})$	<i>n</i> -3				
		kontrola	olje	škrob	sol		kontrola	olje	škrob	sol	$p_N(\text{SEM})$
1	IR	0,26 ^{Bb}	0,38 ^{Aa}	0,36 ^{Aa}	0,40 ^{Ab}	*(0,03)	0,40 ^{Ba}	0,84 ^{Aa}	0,32 ^{BCa}	0,24 ^{Ca}	*** (0,04)
	pečica	0,38 ^{Ba}	0,44 ^{Ba}	0,24 ^{Cb}	0,85 ^{Aa}	*** (0,02)	0,29 ^{Cc}	0,60 ^{Ab}	0,37 ^{Ba}	0,25 ^{Ca}	** (0,02)
	žar	0,39 ^{Aa}	0,21 ^{Bb}	0,20 ^{Bb}	0,15 ^{Bc}	** (0,03)	0,33 ^{Ab}	0,30 ^{Ac}	0,19 ^{Bb}	0,17 ^{Bb}	** (0,02)
	$p_{TO}(\text{SEM})$	** (0,01)	*(0,03)	*(0,03)	*** (0,03)		** (0,01)	** (0,04)	*(0,03)	** (0,01)	
5	IR	0,46	0,47	0,22	0,19	nz (0,14)	0,28 ^B	1,54 ^{Aa}	0,27 ^B	0,22 ^{Bc}	** (0,02)
	pečica	0,66 ^A	0,28 ^B	0,22 ^B	0,36 ^B	*(0,08)	0,40	0,52 ^b	0,26	0,30 ^b	nz (0,09)
	žar	2,84	0,38	0,41	0,37	nz (1,67)	0,47	0,48 ^b	0,37	0,39 ^a	nz (0,05)
	$p_{TO}(\text{SEM})$	nz (1,94)	nz (0,07)	nz (0,06)	nz (0,05)		nz (0,06)	** (0,14)	nz (0,03)	** (0,02)	
9	IR	0,42 ^a	0,35 ^b	0,34	0,48 ^a	nz (0,04)	1,42 ^{Aa}	0,35 ^{Cb}	0,26 ^{Cb}	0,53 ^B	*** (0,04)
	pečica	0,37 ^{Ba}	1,30 ^{Aa}	0,41 ^B	0,39 ^{Bab}	*** (0,04)	0,45 ^{Bb}	1,52 ^{Aa}	0,40 ^{BCa}	0,31 ^C	*** (0,04)
	žar	0,19 ^{Bb}	0,31 ^{Ab}	0,33 ^A	0,33 ^{Ab}	** (0,02)	0,36 ^c	0,27 ^b	0,32 ^b	0,34	nz (0,02)
	$p_{TO}(\text{SEM})$	*(0,05)	*** (0,02)	nz (0,03)	*(0,03)		*** (0,02)	*** (0,04)	*(0,02)	nz (0,05)	

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_N , statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B,C,D}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod); p_{TO} , statistična verjetnost vpliva načina toplotne obdelave; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med načini toplotne obdelave)

without – carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_N , statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A,B,C,D}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different juniper berries extract carriers); p_{TO} , statistical probability of type of thermal treatment effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (^{a,b,c}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different types of thermal treatment)

Priloga C.5: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n-3*–obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C in v modificirani atmosferi na vsebnost posameznih in skupnih oksidov holesterola (OH) in holesterola (mg/kg) ter obseg oksidacije (%) v presnih mariniranih piščančjih mini filejih

Annex C.5: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n-3* enriched) and storage time at temperature of (4 ± 1) °C in modified atmosphere on content of individual and total cholesterol oxides (OH) and cholesterol (mg kg⁻¹) as well as rate of oxidation (%) of raw marinated chicken inner fillets

OH dan/obogatitev	kontrola			olja			škrob			sol		
	običajen	<i>n-3</i>	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n-3</i>	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n-3</i>	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n-3</i>	<i>p_E</i> (SEM)
7α-HC												
1	4,60 ^{Aa}	0,00 ^{Bc}	*** (0,16)	6,48 ^{Ba}	8,42 ^{Ab}	** (0,38)	11,62 ^{Aa}	9,29 ^{Ba}	** (0,53)	11,15 ^b	11,77 ^b	nz(0,57)
5	5,00 ^a	8,45 ^a	nz(2,68)	5,97 ^{Aa}	4,99 ^{Bc}	* (0,28)	2,42 ^{Bc}	3,72 ^{Ab}	*** (0,16)	13,24 ^{Aa}	8,32 ^{Bc}	*** (0,55)
9	5,33 ^{Ba}	6,85 ^{Ab}	** (0,31)	4,26 ^{Bb}	25,59 ^{Aa}	*** (0,92)	3,92 ^b	5,85 ^b	nz(2,13)	0,00 ^{Bc}	23,58 ^{Aa}	*** (0,83)
<i>p_D</i> (SEM)	nz(2,36)	*** (0,31)		** (0,28)	*** (0,79)		*** (0,36)	** (1,99)		*** (0,50)	*** (0,80)	
7β-HC												
1	21,94 ^{Aa}	1,89 ^{Bc}	*** (0,78)	20,34 ^{Ab}	2,28 ^{Bb}	*** (0,72)	10,30 ^{Ab}	9,41 ^{Aa}	nz(0,49)	4,91 ^{Bc}	6,05 ^{Ab}	** (0,28)
5	3,32 ^c	4,62 ^b	nz(1,03)	2,65 ^c	2,57 ^b	nz(0,13)	1,63 ^{Bc}	3,03 ^{Ab}	*** (0,12)	5,78 ^b	5,69 ^b	nz(0,29)
9	6,37 ^b	6,66 ^a	nz(0,33)	55,91 ^{Ba}	87,49 ^{Aa}	*** (3,67)	27,22 ^{Aa}	3,33 ^{Bb}	*** (1,00)	10,22 ^{Ba}	18,94 ^{Aa}	*** (0,76)
<i>p_D</i> (SEM)	*** (1,05)	*** (0,24)		*** (1,72)	*** (2,53)		*** (0,84)	*** (0,81)		*** (0,37)	*** (0,60)	
20α-HC												
1	0,24 ^{Aa}	0,00 ^{Bc}	*** (0,01)	0,81 ^{Ab}	0,18 ^{Bb}	*** (0,03)	0,01 ^{Bb}	0,96 ^{Aa}	*** (0,03)	0,37 ^{Bc}	0,43 ^{Ab}	* (0,02)
5	0,19 ^a	0,13 ^b	nz(0,12)	0,22 ^{Ac}	0,06 ^{Bc}	*** (0,01)	0,19 ^{Ab}	0,16 ^{Bb}	* (0,01)	0,45 ^{Ab}	0,01 ^{Bc}	*** (0,02)
9	0,08 ^{Ba}	0,62 ^{Aa}	*** (0,02)	1,93 ^{Aa}	0,61 ^{Ba}	*** (0,07)	3,48 ^{Aa}	0,28 ^{Bb}	*** (0,17)	1,34 ^{Aa}	1,14 ^{Ba}	* (0,06)
<i>p_D</i> (SEM)	nz(0,11)	*** (0,02)		*** (0,06)	*** (0,02)		*** (0,10)	*** (0,15)		*** (0,04)	*** (0,04)	
22-HC												
1	2,66 ^{Ab}	1,12 ^{Bc}	*** (0,10)	8,81 ^{Ba}	14,07 ^{Aa}	*** (0,59)	10,53 ^{Ba}	16,00 ^{Aa}	*** (0,68)	7,28 ^{Bc}	13,60 ^{Ab}	*** (0,55)
5	11,61 ^a	11,22 ^a	nz(4,23)	7,50 ^{Bb}	9,03 ^{Ac}	* (0,42)	7,93 ^{Ab}	5,33 ^{Bb}	*** (0,34)	10,73 ^{Bb}	15,44 ^{Aa}	*** (0,66)
9	0,69 ^{Bb}	5,34 ^{Ab}	*** (0,19)	6,59 ^{Bc}	12,02 ^{Ab}	*** (0,48)	0,80 ^{Bc}	13,74 ^{Aa}	*** (3,47)	13,10 ^a	14,09 ^{ba}	nz(0,68)
<i>p_D</i> (SEM)	*** (3,72)	*** (0,36)		** (0,38)	** (0,59)		*** (0,38)	** (3,24)		*** (0,53)	* (0,72)	
25-HC												
1	8,99 ^{Aa}	1,20 ^{Ba}	*** (0,32)	3,17 ^{Ab}	0,31 ^{Bb}	*** (0,11)	3,04 ^{Ba}	3,92 ^{Aa}	** (0,18)	0,39 ^{Ab}	0,27 ^{Bc}	*** (0,02)
5	0,12 ^{Bc}	0,66 ^{Ab}	*** (0,12)	0,32 ^{Ac}	0,07 ^{Bb}	*** (0,01)	1,06 ^{Ac}	0,00 ^{Bb}	*** (0,04)	0,00 ^{Bb}	3,98 ^{Aa}	*** (0,14)
9	0,58 ^{Ab}	0,00 ^{Bc}	*** (0,02)	16,06 ^{Aa}	11,57 ^{Ba}	** (0,70)	1,87 ^{Ab}	0,95 ^{Ab}	nz(0,85)	22,29 ^{Aa}	0,88 ^{Bb}	*** (0,79)
<i>p_D</i> (SEM)	*** (0,24)	*** (0,04)		*** (0,47)	*** (0,33)		*** (0,11)	*** (0,79)		*** (0,64)	*** (0,12)	
skupni OH												
1	38,44 ^{Aa}	4,21 ^{Bc}	*** (1,37)	39,61 ^{Ab}	25,26 ^{Bb}	*** (1,66)	35,50 ^a	39,58 ^a	nz(1,88)	24,10 ^{Bc}	32,11 ^{Ab}	** (1,42)
5	20,25 ^b	25,07 ^a	nz(8,18)	16,67 ^c	16,72 ^c	nz(0,83)	13,22 ^b	12,24 ^c	nz(0,64)	30,20 ^b	33,45 ^b	nz(1,59)
9	13,06 ^{Bb}	19,47 ^{Ab}	*** (0,83)	84,76 ^{Ba}	137,28 ^{Aa}	*** (5,70)	37,30 ^{Aa}	24,15 ^{Bb}	** (5,61)	46,95 ^{Ba}	58,62 ^{Aa}	** (2,66)
<i>p_D</i> (SEM)	** (7,25)	*** (0,92)		*** (2,74)	*** (4,06)		*** (1,53)	*** (5,24)		*** (1,76)	*** (2,16)	
oksidacija (%)												
1	4,76 ^{Aa}	0,55 ^{Bc}	*** (0,00)	5,21 ^{Ab}	3,30 ^{Bb}	*** (0,00)	4,78 ^{Ba}	4,99 ^{Aa}	*** (0,00)	2,88 ^{Bc}	3,77 ^{Ac}	*** (0,00)
5	2,57 ^b	2,94 ^a	nz(0,93)	2,00 ^{Bc}	2,17 ^{Ac}	*** (0,00)	1,76 ^{Ac}	1,58 ^{Bc}	*** (0,00)	3,56 ^{Bb}	4,18 ^{Ab}	*** (0,00)
9	1,77 ^{Bb}	2,58 ^{Ab}	*** (0,00)	9,60 ^{Ba}	14,21 ^{Aa}	*** (0,00)	4,40 ^{Ab}	3,00 ^{Bb}	** (0,60)	5,92 ^{Ba}	6,56 ^{Aa}	*** (0,00)
<i>p_D</i> (SEM)	** (0,82)	*** (0,00)		*** (0,00)	*** (0,00)		*** (0,00)	*** (0,56)		*** (0,00)	*** (0,00)	
holesterol												
1	768,93	765,61	nz(38,36)	721,02 ^b	740,75	nz(36,55)	706,98 ^b	753,33	nz(36,53)	811,93	819,85	nz(40,79)
5	750,43	827,06	nz(46,42)	818,59 ^a	754,40	nz(39,36)	738,70 ^{ba}	763,05	nz(37,55)	818,59	766,71	nz(39,65)
9	726,60	736,65	nz(36,58)	797,73 ^{ba}	828,78	nz(40,67)	811,10 ^a	778,07	nz(46,66)	745,59	834,41	nz(39,56)
<i>p_D</i> (SEM)	nz(43,79)	nz(38,87)		* (39,01)	nz(38,78)		* (37,68)	nz(45,28)		nz(39,64)	nz(40,38)	

kontrola – nosilci (olja, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_E*, statistična verjetnost vpliva *n-3*–obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n-3*–obogatenimi mini fileji); *p_D*, statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

without - carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz – $p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_E*, statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A,B}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between control and *n-3*–enriched inner fillets); *p_D*, statistical probability of storage time effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (^{a,b,c}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between times of storage)

Priloga C.6: Vpliv različnih nosilcev (kontrola, olje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na vsebnost posameznih in skupnih oksidov holesterola (OH) in holesterola (mg/kg) ter obseg oksidacije (%) v presnih mariniranih običajnih in *n*-3-obogatenih mini piščančjih filejih, pakiranih v modificirani atmosferi med devetdnevni skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C

Annex C.6: Effect of different juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on content of individual and total cholesterol oxides (OH) and cholesterol (mg kg⁻¹) as well as rate of oxidation (%) of raw marinated chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n*-3 enriched) and without (control), during 9 days of storing in modified atmosphere and at temperature of (4 ±1) °C

OH	običajen					<i>n</i> -3					
	dan/nosilec	kontrola	olje	škrob	sol	<i>p</i> _N (SEM)	kontrola	olje	škrob	sol	<i>p</i> _N (SEM)
7α-HC	1	4,60 ^C	6,48 ^B	11,62 ^A	11,15 ^A	***(0,45)	0,00 ^D	8,42 ^C	9,29 ^B	11,77 ^A	***(0,43)
	5	5,00 ^B	5,97 ^B	2,42 ^B	13,24 ^A	***(2,16)	8,45 ^A	4,99 ^B	3,72 ^C	8,32 ^A	***(0,33)
	9	5,33 ^A	4,26 ^B	3,92 ^B	0,00 ^C	***(0,20)	6,85 ^B	25,59 ^A	5,85 ^B	23,58 ^A	***(1,96)
7β-HC	1	21,94 ^A	20,34 ^B	10,30 ^C	4,91 ^D	***(0,80)	1,89 ^C	2,28 ^C	9,41 ^A	6,05 ^B	***(0,29)
	5	3,32 ^B	2,65 ^{BC}	1,63 ^C	5,78 ^A	***(0,83)	4,62 ^B	2,57 ^D	3,03 ^C	5,69 ^A	***(0,21)
	9	6,38 ^D	55,91 ^A	27,22 ^B	10,22 ^C	***(1,58)	6,66 ^C	87,49 ^A	3,33 ^D	18,94 ^B	***(1,71)
20α-HC	1	0,24 ^C	0,81 ^A	0,01 ^D	0,37 ^B	***(0,02)	0,00 ^D	0,18 ^C	0,96 ^A	0,43 ^B	***(0,03)
	5	0,19 ^B	0,22 ^B	0,19 ^B	0,45 ^A	*(0,10)	0,13 ^B	0,06 ^C	0,16 ^A	0,01 ^D	***(0,01)
	9	0,08 ^D	1,93 ^B	3,48 ^A	1,34 ^C	***(0,10)	0,62 ^B	0,61 ^B	0,28 ^C	1,14 ^A	***(0,14)
22-HC	1	2,66 ^D	8,81 ^B	10,53 ^A	7,28 ^C	***(0,39)	1,12 ^C	14,07 ^B	16,00 ^A	13,60 ^B	***(0,63)
	5	11,61	7,51	7,93 ^A	10,73	nz(3,38)	11,22 ^B	9,03 ^C	5,33 ^D	15,44 ^A	***(0,54)
	9	0,69 ^C	6,59 ^B	0,80 ^C	13,10 ^A	***(0,37)	5,34 ^B	12,02 ^A	13,74 ^A	14,09 ^A	*(3,05)
25-HC	1	8,99 ^A	3,17 ^B	3,04 ^B	0,39 ^C	***(0,25)	1,20 ^B	0,31 ^C	3,92 ^A	0,27 ^C	***(0,10)
	5	0,12 ^C	0,32 ^B	1,06 ^A	0,00 ^C	***(0,10)	0,66 ^B	0,07 ^C	0,00 ^C	3,98 ^A	***(0,10)
	9	0,58 ^C	16,06 ^B	1,87 ^C	22,29 ^A	***(0,69)	0,00 ^B	11,57 ^A	0,95 ^B	0,88 ^B	***(0,76)
skupni OH	1	38,44 ^{AB}	39,61 ^A	35,50 ^B	24,10 ^C	***(1,75)	4,21 ^D	25,26 ^C	39,58 ^A	32,11 ^B	***(1,43)
	5	20,25 ^{AB}	16,67 ^B	13,22 ^B	30,20 ^A	*(6,55)	25,07 ^B	16,72 ^C	12,24 ^D	33,44 ^A	***(1,17)
	9	13,06 ^D	84,76 ^A	37,30 ^C	46,95 ^B	***(2,62)	19,47 ^C	137,28 ^A	24,15 ^C	58,62 ^B	***(5,51)
oksidacija (%)	1	4,76 ^C	5,21 ^A	4,78 ^B	2,88 ^D	***(0,00)	0,55 ^D	3,30 ^C	4,99 ^A	3,77 ^B	***(0,00)
	5	2,57	2,00	1,76	3,56	nz(0,74)	2,94 ^B	2,17 ^C	1,58 ^D	4,18 ^A	***(0,00)
	9	1,77 ^D	9,60 ^A	4,40 ^C	5,92 ^B	***(0,00)	2,58 ^C	14,21 ^A	3,00 ^C	6,56 ^B	***(0,53)
holesterol	1	768,93 ^{AB}	721,02 ^B	706,98 ^B	811,93 ^A	*(37,67)	765,61	740,75	753,33	819,85	nz(38,52)
	5	750,43	818,59	738,70	818,59	nz(43,79)	827,06	754,40	763,05	766,71	nz(38,92)
	9	726,60	797,73	811,10	745,59	nz(38,55)	736,65 ^B	828,78 ^A	778,07 ^{AB}	834,41 ^A	*(45,14)

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p*_N, statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B,C,D}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod)

without - carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p*_N, statistical probability of juniper berries extract carrier effect; means with a different superscript within rows (^{A,B,C,D}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different juniper berries extract carriers)

Priloga C.7: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n-3*-obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C na vsebnost kreatina, kreatinina in skupnega kreatina (mMol/kg) v presnih mariniranih piščančjih mini filejih pakiranih v modificirani atmosferi

Annex C.7: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n-3* enriched) and storage time at temperature of (4 ± 1) °C on content of creatine, creatinine and total creatine (mMol kg⁻¹) of raw marinated chicken inner fillets, packed in modified atmosphere

Nosilec	kontrola			olje			škrob			sol						
	Dan/obogatitev	običajen	<i>n-3</i>	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n-3</i>	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n-3</i>	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n-3</i>	<i>p_E</i> (SEM)			
kreatin																
1	5,03 ^{Bb}	6,61 ^{Ab}	**	(0,01)	4,38 ^b	5,89 ^c	nz	(0,47)	6,12 ^b	6,62 ^c	nz	(0,02)	4,79 ^{Bc}	6,03 ^{Ac}	*	(0,32)
5	5,08 ^{Bb}	6,84 ^{Ab}	**	(0,30)	8,90 ^a	8,97 ^a	nz	(0,02)	7,88 ^{Aa}	8,25 ^{Ab}	**	(0,49)	5,97 ^{Bb}	6,91 ^{Ab}	*	(0,02)
9	9,49 ^a	9,34 ^a	nz	(0,47)	8,49 ^a	8,18 ^b	nz	(0,01)	8,46 ^{Ba}	10,86 ^{Aa}	**	(0,27)	8,35 ^{Ba}	9,84 ^{Aa}	**	(0,29)
<i>p_D</i> (SEM)	***	(0,34)	***	(0,38)	***	(0,38)	***	(0,39)	***	(0,38)	***	(0,44)	***	(0,33)	***	(0,39)
kreatinin																
1	0,24 ^{Bb}	0,31 ^{Ab}	**	(0,01)	0,20 ^b	0,27 ^b	nz	(0,45)	0,28 ^b	0,30 ^c	nz	(0,42)	0,23 ^{Bc}	0,29 ^{Ac}	**	(0,34)
5	0,24 ^{Bb}	0,33 ^{Ab}	**	(0,32)	0,42 ^a	0,40 ^a	nz	(0,44)	0,39 ^a	0,39 ^b	nz	(0,51)	0,27 ^{Bb}	0,33 ^{Ab}	*	(0,48)
9	0,46 ^a	0,45 ^a	nz	(0,49)	0,39 ^a	0,39 ^a	nz	(0,32)	0,39 ^{Ba}	0,52 ^{Aa}	**	(0,29)	0,39 ^{Ba}	0,45 ^{Aa}	*	(0,46)
<i>p_D</i> (SEM)	***	(0,02)	***	(0,02)	***	(0,02)	***	(0,02)	***	(0,02)	***	(0,02)	***	(0,02)	***	(0,02)
skupni kreatin																
1	5,27 ^{Bb}	6,92 ^{Ab}	**	(0,27)	4,58 ^b	6,16 ^b	nz	(0,02)	6,40 ^b	6,92 ^c	nz	(0,40)	5,02 ^{Bc}	6,32 ^{Ac}	*	(0,02)
5	5,33 ^{Bb}	7,17 ^{Ab}	**	(0,01)	9,31 ^a	9,37 ^a	nz	(0,42)	8,27 ^{Aa}	8,64 ^{Ab}	**	(0,02)	6,24 ^{Bb}	7,24 ^{Ab}	*	(0,46)
9	9,96 ^a	9,79 ^a	nz	(0,02)	8,88 ^a	8,57 ^a	nz	(0,33)	8,85 ^{Ba}	11,38 ^{Aa}	**	(0,01)	8,73 ^{Ba}	10,29 ^{Aa}	**	(0,31)
<i>p_D</i> (SEM)	***	(0,36)	***	(0,40)	***	(0,39)	***	(0,41)	***	(0,40)	***	(0,46)	***	(0,34)	***	(0,41)

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_E*, statistična verjetnost vpliva *n-3*-obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n-3*-obogatenimi mini fileji); *p_D*, statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

without - carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_E*, statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A,B}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between control and *n-3*-enriched inner fillets); *p_D*, statistical probability of storage time effect; means with a different superscript within columns (^{a,b,c}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between times of storage)

Priloga C.8: Vpliv različnih nosilcev (kontrola, olje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na vsebnost kreatina, kreatinina in skupnega kreatina (mMol kg⁻¹) v presnih običajnih in *n*-3–obogatenih piščančjih mini filejih, pakiranih v modificirani atmosferi, med devetdnevno skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C

Annex C.8: Effect of different juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on content of creatine, creatinine and total creatine (mMol kg⁻¹) of raw chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n*-3 enriched) and without (control), during 9 days of storing in modified atmosphere and at temperature of (4 ±1) °C

Parameter	Obogatitev običajen					<i>p_N</i> (SEM)	<i>n</i> -3				
	Dan/nosilec	kontrola	olje	škrob	sol		kontrola	olje	škrob	sol	<i>p_N</i> (SEM)
kreatin	1	5,03 ^B	4,38 ^C	6,12 ^A	4,79 ^{CB}	***(0,26)	6,61 ^A	5,89 ^B	6,62 ^A	6,03 ^{BA}	*(0,31)
	5	5,08 ^D	8,90 ^A	7,88 ^B	5,97 ^C	***(0,36)	6,84 ^B	8,97 ^A	8,25 ^A	6,91 ^B	***(0,39)
	9	9,49 ^A	8,49 ^B	8,46 ^B	8,35 ^B	*(0,44)	9,34 ^B	8,18 ^C	10,86 ^A	9,84 ^B	** (0,48)
kreatinin	1	0,24 ^B	0,20 ^C	0,28 ^A	0,23 ^B	*** (0,01)	0,31	0,27	0,30	0,29	nz(0,01)
	5	0,24 ^C	0,42 ^A	0,39 ^B	0,27 ^C	*** (0,02)	0,33 ^B	0,40 ^A	0,39 ^A	0,33 ^B	** (0,02)
	9	0,46 ^A	0,39 ^B	0,39 ^B	0,39 ^B	** (0,02)	0,45 ^B	0,39 ^C	0,52 ^A	0,45 ^B	** (0,02)
skupni	1	5,27 ^B	4,58 ^C	6,40 ^A	5,02 ^{CB}	*** (0,27)	6,92 ^A	6,16 ^B	6,92 ^A	6,32 ^{BA}	*(0,33)
kreatin	5	5,33 ^D	9,31 ^A	8,27 ^B	6,24 ^C	*** (0,37)	7,17 ^B	9,37 ^A	8,64 ^A	7,24 ^B	*** (0,41)
	9	9,96 ^A	8,88 ^B	8,85 ^B	8,73 ^B	*(0,46)	9,79 ^B	8,57 ^C	11,38 ^A	10,29 ^B	*** (0,50)

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_N , statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod)

without - carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_N , statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different juniper berries extract carriers)

Priloga C.9: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3–obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ±1) °C na vsebnost posameznih in skupnih HAA (ng/kg) v piščančjih mini filejih, mariniranih samo z dodanimi nosilci (olje, škrob in sol, brez dodanega ekstrakta brinovih jagod), pakiranih v modificirano atmosfero, pečenih na dvoploščnem žaru, v pečici in pečici IR

Annex C.9: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and storage time at temperature of (4 ±1) °C in modified atmosphere on content of individual and total HAA (ng kg⁻¹) of marinated chicken inner fillets with added carriers (oil, starch and salt, without juniper berries extract) after thermal treatment on two-plated grill, oven and IR oven

HAA	Način TO	IR			pečica			žar		
		dan/obogatitev	običajen	<i>n</i> -3	<i>p</i> _E (SEM)	običajen	<i>n</i> -3	<i>p</i> _E (SEM)	običajen	<i>n</i> -3
4,8-Di MeIQ	1	0	0	- (0)	0	0 ^c	- (0)	0 ^{CB}	4 ^{BA}	*** (0)
	5	0	0	- (0)	0	0 ^b	- (0)	3 ^{BA}	1 ^{CB}	*** (0)
	9	0	0	- (0)	0	2 ^a	*** (0)	7 ^a	6 ^a	nz (1)
	<i>p</i> _D (SEM)	- (0)	- (0)		- (0)	*** (0)		*** (1)	*** (1)	
7,8-DiMeIQ	1	6 ^{AA}	1 ^{AB}	*** (0)	2 ^{BB}	7 ^{AA}	*** (0)	7 ^{AA}	6 ^{BB}	** (0)
	5	7 ^a	0 ^b	nz (5)	3 ^{AA}	2 ^{CB}	*** (0)	5 ^b	5 ^c	nz (0)
	9	0 ^a	0 ^b	nz (0)	1 ^{CB}	4 ^{BA}	*** (0)	7 ^a	7 ^a	nz (0)
	<i>p</i> _D (SEM)	*** (4)	*** (0)		*** (0)	*** (0)		*** (0)	*** (0)	
Glu-P-2	1	52 ^{BA}	23 ^{BB}	*** (2)	11 ^{BB}	100 ^{AA}	*** (4)	83 ^{AA}	0 ^{CB}	*** (3)
	5	77 ^{AA}	28 ^{AB}	*** (0)	23 ^{AA}	11 ^{CB}	*** (1)	48 ^{CA}	27 ^{BB}	*** (2)
	9	9 ^{CB}	19 ^{CA}	*** (1)	8 ^{BB}	18 ^{BA}	** (2)	64 ^{BA}	43 ^{AB}	*** (3)
	<i>p</i> _D (SEM)	*** (2)	*** (1)		*** (2)	*** (3)		*** (3)	*** (2)	
harman	1	32 ^{BA}	6 ^{BB}	*** (1)	13 ^{BB}	24 ^{AA}	*** (1)	34 ^{BA}	29 ^{AB}	* (2)
	5	45 ^{AA}	7 ^{AB}	*** (0)	21 ^{AA}	4 ^{BB}	*** (1)	42 ^{AA}	3 ^{BB}	*** (1)
	9	4 ^{CA}	4 ^{CB}	* (0)	3 ^c	3 ^b	nz (0)	8 ^c	4 ^b	nz (3)
	<i>p</i> _D (SEM)	*** (1)	*** (0)		*** (1)	*** (1)		*** (2)	*** (2)	
IQ	1	0 ^B	1 ^{AA}	*** (0)	6 ^{AA}	0 ^{AB}	*** (0)	0	0	- (0)
	5	0	0 ^b	- (0)	0 ^b	2 ^a	nz (2)	0	0	- (0)
	9	0	0 ^b	- (0)	0 ^{BB}	0 ^{AA}	*** (0)	0	0	- (0)
	<i>p</i> _D (SEM)	nz (0)	*** (0)		*** (0)	*** (1)		- (0)	- (0)	
MeIQ	1	69 ^{BA}	35 ^{BB}	*** (3)	49 ^b	66 ^{AA}	** (3)	156 ^{BA}	77 ^{AB}	*** (6)
	5	116 ^{AA}	83 ^{AB}	*** (4)	89 ^a	31 ^{CB}	*** (4)	104 ^{BA}	59 ^{BB}	*** (4)
	9	38 ^{CB}	84 ^{AA}	** (9)	28 ^c	56 ^{BA}	* (11)	473 ^{AA}	53 ^{BB}	* (158)
	<i>p</i> _D (SEM)	*** (8)	*** (3)		nz (9)	*** (3)		*** (129)	*** (3)	
MeIQx	1	108 ^{BA}	94 ^{AB}	* (5)	131 ^b	133 ^a	nz (7)	153 ^b	147 ^b	nz (8)
	5	164 ^{AA}	80 ^{BB}	** (12)	187 ^{AA}	54 ^{CB}	*** (9)	172 ^{BA}	147 ^{BB}	* (8)
	9	36 ^c	25 ^c	nz (16)	58 ^c	76 ^b	nz (14)	416 ^a	315 ^a	nz (52)
	<i>p</i> _D (SEM)	* (17)	*** (3)		*** (13)	*** (6)		*** (34)	*** (27)	
norharman	1	10 ^{CB}	19 ^{CA}	*** (1)	0 ^{CB}	18 ^{CA}	*** (1)	15 ^{CB}	44 ^{CA}	*** (2)
	5	25 ^{AB}	31 ^{AA}	*** (1)	11 ^{BB}	25 ^{BA}	*** (1)	50 ^{BB}	60 ^{BA}	*** (3)
	9	15 ^{BB}	26 ^{BA}	*** (1)	15 ^{AB}	31 ^{AA}	*** (1)	163 ^{AA}	123 ^{AB}	** (6)
	<i>p</i> _D (SEM)	*** (1)	* (1)		*** (0)	*** (1)		*** (2)	*** (5)	
PhIP	1	78 ^{AA}	52 ^{BB}	*** (3)	43 ^{BB}	93 ^{CA}	*** (4)	229 ^{CB}	1008 ^{BA}	*** (37)
	5	170 ^{AA}	58 ^{AB}	* (35)	73 ^{AB}	191 ^{BA}	*** (4)	1167 ^b	1084 ^b	nz (56)
	9	99 ^a	34 ^c	nz (50)	29 ^{CB}	285 ^{AA}	*** (10)	2829 ^{AA}	2230 ^{AB}	** (111)
	<i>p</i> _D (SEM)	*** (50)	*** (2)		*** (3)	*** (9)		*** (34)	*** (100)	
vsota	1	356 ^{BA}	234 ^{BB}	*** (15)	258 ^{BB}	443 ^{AA}	*** (18)	696 ^{CB}	1315 ^{BA}	*** (53)
	5	604 ^{AA}	286 ^{AB}	*** (45)	418 ^{AA}	323 ^{BB}	** (18)	1594 ^{BA}	1389 ^{BB}	* (75)
	9	202 ^c	191 ^c	nz (73)	147 ^{CB}	476 ^{AA}	*** (17)	3968 ^{AA}	2782 ^{AB}	** (251)
	<i>p</i> _D (SEM)	*** (70)	*** (9)		*** (14)	*** (21)		*** (168)	*** (139)	

značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz - $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p*_E, statistična verjetnost vpliva *n*-3–obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n*-3–obogatjenimi mini fileji); *p*_D, statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz - $p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p*_E, statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A,B}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between control and *n*-3–enriched inner fillets); *p*_D, statistical probability of storage time effect; means with a different superscript within columns (^{a,b,c}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between times of storage)

Priloga C.10: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n-3*-obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C na vsebnost posameznih in skupnih HAA (ng/kg) v mariniranih (z brinovim ekstraktom, vezanim na olje) piščančjih mini filejih, pakiranih v modificirano atmosfero in pečenih na dvoploščnem žaru, v pečici in pečici IR

Annex C.10: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n-3* enriched) and storage time at temperature of (4 ± 1) °C in modified atmosphere on content of individual and total HAA (ng kg⁻¹) of marinated (with juniper berries extract bounded on oil) chicken inner fillets after thermal treatment on two-plated grill, oven and IR oven

HAA	Način TO		IR		pečica		žar		p _E (SEM)	
	dan/obogatitev	običajen	n-3	p _E (SEM)	običajen	n-3	p _E (SEM)	običajen		n-3
4,8-Di MeIQ	1	0 ^c	0	-(0)	0	0	-(0)	3 ^{bA}	1 ^{aB}	*(0)
	5	1 ^{bA}	0 ^B	*(0)	0	0	-(0)	6 ^{aA}	3 ^{aB}	*(1)
	9	1 ^{aA}	0 ^B	*(0)	0	0	-(0)	7 ^{aA}	2 ^{aB}	*(1)
	p _D (SEM)	*** (0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	*** (1)	*** (1)		
7,8-DiMeIQ	1	5 ^{bA}	2 ^{aB}	*(0)	6 ^b	6 ^b	nz(0)	4 ^{bB}	4 ^{bA}	*(0)
	5	25 ^{aA}	1 ^{bB}	*(7)	11 ^{aB}	12 ^{aA}	*(0)	6 ^a	7 ^a	nz(1)
	9	0 ^b	0 ^b	nz(0)	5 ^{cA}	4 ^{cB}	*(0)	6 ^{aB}	8 ^{aA}	*(1)
	p _D (SEM)	*** (5)	*** (0)	nz(0)	*** (0)	*** (0)	*** (1)	*** (0)		
Glu-P-2	1	30 ^{bA}	17 ^{aB}	*(1)	0 ^{cB}	80 ^{bA}	*(3)	12 ^{cB}	53 ^{bA}	*(2)
	5	43 ^{aA}	7 ^{bB}	*(1)	11 ^{bB}	121 ^{aA}	*(3)	46 ^b	46 ^c	nz(2)
	9	12 ^{cA}	5 ^{bB}	*(1)	16 ^{aA}	1 ^{cB}	*(1)	56 ^{aB}	71 ^{aA}	*(2)
	p _D (SEM)	*** (1)	*** (1)	*** (0)	*** (3)	*** (2)	*** (2)	*** (2)		
harman	1	8 ^{bB}	16 ^{aA}	*(1)	9 ^{bB}	25 ^{bA}	*(1)	25 ^{bB}	38 ^{aA}	*(2)
	5	13 ^{aA}	3 ^{bB}	*(0)	19 ^{aB}	54 ^{aA}	*(1)	6 ^c	5 ^b	nz(1)
	9	4 ^c	4 ^b	nz(1)	1 ^{cB}	19 ^{cA}	*(1)	61 ^{aA}	3 ^{bB}	*(3)
	p _D (SEM)	*** (0)	nz(1)	*** (1)	*** (1)	*** (2)	*** (2)	*** (2)		
IQ	1	0 ^{aA}	0 ^{aA}	-(0)	0 ^{aA}	0 ^{aA}	-(0)	0 ^{bA}	0 ^{aA}	-(0)
	5	0 ^{aA}	0 ^{aA}	nz(0)	0 ^{aA}	0 ^{aA}	-(0)	0 ^{bA}	0 ^{aA}	-(0)
	9	0 ^{aA}	0 ^{aA}	nz(0)	0 ^{aA}	0 ^{aA}	-(0)	1 ^{aA}	0 ^{aB}	*(0)
	p _D (SEM)	*** (0)	-(0)	nz(0)	-(0)	*** (0)	*** (0)	*** (0)		
MeIQ	1	55 ^{bA}	49 ^{aB}	*(3)	59 ^{bB}	104 ^{bA}	*(4)	42 ^{cB}	114 ^{aA}	*(4)
	5	85 ^{aA}	37 ^{aB}	*(8)	98 ^{aB}	227 ^{aA}	*(1)	94 ^b	96 ^b	nz(10)
	9	32 ^{cA}	11 ^{bB}	*(1)	45 ^{cB}	84 ^{cA}	*(3)	135 ^{aA}	114 ^{aB}	*(6)
	p _D (SEM)	*** (2)	*** (7)	*** (2)	*** (4)	*** (9)	*** (5)			
MeIQx	1	780 ^{bB}	1200 ^{aA}	*(51)	414 ^{bA}	327 ^{bB}	*(19)	251 ^{bA}	157 ^{bB}	*(10)
	5	962 ^{aA}	84 ^{bB}	*(22)	516 ^{aA}	455 ^{aB}	*(3)	354 ^a	324 ^a	nz(33)
	9	119 ^c	58 ^b	nz(33)	68 ^c	73 ^c	nz(4)	256 ^{bB}	341 ^{aA}	*(10)
	p _D (SEM)	*** (39)	*** (35)	*** (12)	*** (10)	*** (26)	*** (14)			
norharman	1	0 ^c	0	-(0)	0 ^c	0 ^c	-(0)	31 ^b	31 ^c	nz(2)
	5	16 ^{bB}	23 ^A	*(2)	16 ^{bB}	18 ^{aA}	*(0)	106 ^a	109 ^b	nz(4)
	9	23 ^a	24	nz(5)	22 ^{aA}	13 ^{bB}	*(1)	105 ^{aB}	143 ^{aA}	*(4)
	p _D (SEM)	*** (3)	nz(4)	*** (1)	*(0)	*** (4)	*** (2)			
PhIP	1	128 ^{bA}	76 ^{aB}	*(5)	49 ^{cB}	87 ^{bA}	*(4)	773 ^{bA}	577 ^{cB}	*(34)
	5	193 ^{aA}	70 ^{aB}	*(13)	116 ^{aB}	206 ^{aA}	*(1)	2080 ^{aB}	2173 ^{bA}	*(14)
	9	70 ^{cA}	40 ^{bB}	*(11)	83 ^b	83 ^b	nz(4)	2036 ^{aB}	2373 ^{aA}	*(77)
	p _D (SEM)	*** (9)	*** (12)	*** (3)	*** (3)	*** (64)	*** (28)			
vsota	1	1006 ^{bB}	1362 ^{aA}	*(60)	537 ^{bB}	630 ^{bA}	*(29)	1150 ^{bA}	975 ^{cB}	*(53)
	5	1341 ^{aA}	224 ^{bB}	*(22)	789 ^{aB}	1096 ^{aA}	*(6)	2700 ^{aA}	2764 ^{bA}	nz(43)
	9	265 ^{cA}	158 ^{bA}	*(48)	241 ^{cB}	280 ^{cA}	*(13)	2668 ^{aB}	3055 ^{aA}	*(101)
	p _D (SEM)	*** (51)	*** (40)	*** (17)	*** (20)	*** (89)	*** (44)			

značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz - $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_E, statistična verjetnost vpliva *n-3*-obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n-3*-obogatjenimi mini fileji); p_D, statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz - $p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_E, statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A,B}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between control and *n-3*-enriched inner fillets); p_D, statistical probability of storage time effect; means with a different superscript within columns (^{a,b,c}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between times of storage)

Priloga C.11: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3–obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C na vsebnost posameznih in skupnih HAA (ng/kg) v mariniranih (z brinovim ekstraktom, vezanim na škrob) piščančjih mini filejih, pakiranih v modificirano atmosfero in pečenih na dvoploščnem žaru, v pečici in pečici IR

Annex C.11: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and storage time at temperature of (4 ± 1) °C in modified atmosphere on content of individual and total HAA (ng kg⁻¹) of marinated (with juniper berries extract bounded on starch) chicken inner fillets after thermal treatment on two-plated grill, oven and IR oven

HAA	Način TO		IR		pečica		žar		<i>p_F</i> (SEM)	
	dan/obogatitev	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_F</i> (SEM)	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_F</i> (SEM)	običajen		<i>n</i> -3
4,8-Di MeIQ	1	0	0	-(0)	0	0	-(0)	3 ^{aA}	1 ^{aB}	*** (0)
	5	0	0	-(0)	0	0	-(0)	0 ^{bA}	0 ^{bA}	*(0)
	9	0	0	-(0)	0	0	-(0)	0 ^b	0 ^b	nz(3)
	<i>p_D</i> (SEM)	-(0)	-(0)		-(0)	-(0)		*** (1)	*** (2)	
7,8-DiMeIQ	1	1 ^{cA}	0 ^{bB}	*** (0)	6 ^{bA}	0 ^{cB}	*** (0)	6 ^b	6 ^b	nz(0)
	5	4 ^{bA}	3 ^{bB}	*** (0)	10 ^{aA}	1 ^{bB}	*** (0)	6 ^b	4 ^b	nz(1)
	9	11 ^{aA}	7 ^{aA}	*** (0)	3 ^{cA}	2 ^{aB}	** (0)	9 ^a	9 ^a	nz(2)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (0)	*** (0)		*** (0)	*** (0)		*** (0)	** (2)	
Glu-P-2	1	61 ^{bA}	0 ^{cB}	*** (2)	57 ^{bA}	0 ^{cB}	*** (2)	67 ^{bA}	71 ^{aA}	nz(3)
	5	79 ^{aA}	11 ^{bB}	*** (0)	72 ^{aA}	7 ^{bB}	*** (2)	55 ^{bA}	34 ^{bB}	*** (2)
	9	11 ^{cB}	21 ^{aA}	*** (1)	5 ^{cB}	10 ^{aA}	*** (0)	96 ^a	69 ^a	nz(14)
	<i>p_D</i> (SEM)	*(2)	*** (1)		*** (3)	*** (0)		*** (6)	*** (11)	
harman	1	18 ^{bA}	13 ^{bB}	** (1)	41 ^{bA}	12 ^{bB}	*** (2)	33 ^{aB}	46 ^{aA}	** (2)
	5	27 ^{aA}	17 ^{aB}	*** (1)	59 ^{aA}	17 ^{aB}	*** (4)	8 ^b	6 ^b	nz(1)
	9	4 ^c	4 ^c	nz(0)	3 ^c	3 ^c	nz(1)	7 ^b	6 ^b	nz(2)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (1)	nz(1)		*** (3)	*(0)		*** (1)	*** (2)	
IQ	1	0	0	-(0)	0	0	-(0)	0	0	-(0)
	5	0	0	-(0)	0	0	-(0)	0	0	-(0)
	9	0	0	-(0)	0	0	-(0)	0	0	-(0)
	<i>p_D</i> (SEM)	-(0)	-(0)		-(0)	-(0)		-(0)	-(0)	
MeIQ	1	77 ^{bB}	91 ^{bA}	*(4)	89 ^{bA}	29 ^{cB}	*** (3)	113 ^{bA}	96 ^{aB}	*(5)
	5	136 ^{aA}	119 ^{aB}	*** (1)	113 ^{aA}	71 ^{aB}	*** (0)	85 ^{cA}	39 ^{bB}	** (7)
	9	59 ^{cA}	45 ^{cB}	** (3)	22 ^{cB}	50 ^{bA}	** (5)	154 ^{aA}	79 ^{aB}	*** (12)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (3)	*(3)		*** (5)	*** (2)		*** (5)	*** (11)	
MeIQx	1	57 ^{bB}	104 ^{bA}	*** (4)	25 ^{bB}	58 ^{bA}	*** (2)	112 ^c	105 ^c	nz(5)
	5	100 ^{aB}	128 ^{aA}	*** (1)	59 ^{aB}	82 ^{aA}	*(6)	256 ^b	234 ^b	nz(34)
	9	42 ^{cA}	33 ^{cB}	** (2)	47 ^{aA}	16 ^{cB}	*(10)	585 ^{aA}	487 ^{aB}	*(46)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (2)	*** (3)		*** (9)	*** (2)		*** (13)	*** (45)	
norharman	1	8 ^{cA}	0 ^{cB}	*** (0)	16 ^c	17 ^c	nz(1)	39 ^c	38 ^c	nz(2)
	5	37 ^{aA}	16 ^{bB}	*** (0)	35 ^a	36 ^a	nz(2)	115 ^b	104 ^b	nz(6)
	9	35 ^{bA}	29 ^{aB}	*(2)	25 ^b	21 ^b	nz(3)	254 ^{aA}	171 ^{aB}	** (18)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (1)	*** (1)		*** (3)	*** (1)		*** (14)	*** (9)	
PhIP	1	16 ^{cB}	107 ^{bA}	*** (4)	70 ^{bA}	33 ^{cB}	*** (3)	760 ^{cA}	608 ^{cB}	** (34)
	5	36 ^{aB}	129 ^{aA}	*** (1)	112 ^{aA}	68 ^{aB}	*** (2)	2139 ^{bA}	1586 ^{bB}	*** (78)
	9	21 ^{bA}	18 ^{cB}	*(1)	54 ^{cA}	39 ^{bB}	*(5)	3913 ^{aA}	2661 ^{aB}	*** (93)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (1)	*** (3)		*(5)	*** (2)		*** (82)	*** (68)	
vsota	1	244 ^{bB}	321 ^{bA}	** (14)	305 ^{bA}	150 ^{bB}	*** (12)	1135 ^{cA}	973 ^{cB}	*(53)
	5	425 ^{aB}	429 ^{aA}	*(1)	468 ^{aA}	282 ^{aB}	*** (6)	2687 ^{bA}	2011 ^{bB}	** (108)
	9	178 ^{cA}	156 ^{cB}	*(8)	167 ^c	141 ^b	nz(12)	5032 ^{aA}	3491 ^{aB}	*** (136)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (9)	*** (10)		*** (13)	*** (6)		*** (103)	*** (111)	

značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_F*, statistična verjetnost vpliva *n*-3–obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n*-3–obogatjenimi mini fileji); *p_D*, statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz – $p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_F*, statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A,B}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between control and *n*-3–enriched inner fillets); *p_D*, statistical probability of storage time effect; means with a different superscript within columns (^{a,b,c}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between times of storage)

Priloga C.12: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n-3*–obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C na vsebnost posameznih in skupnih HAA (ng/kg) v mariniranih (z brinovim ekstraktom, vezanim na sol) piščančjih mini filejih, pakiranih v modificirano atmosfero, pečenih na dvoploščnem žaru, v pečici in pečici IR

Annex C.12: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n-3* enriched) and storage time at temperature of (4 ± 1) °C in modified atmosphere on content of individual and total HAA (ng kg⁻¹) of marinated (with juniper berries extract bounded on salt) chicken inner fillets after thermal treatment on two-plated grill, oven and IR oven

HAA	TO		IR		pečica		žar		<i>P_E</i> (SEM)	
	dan/obogatitev	običajen	<i>n-3</i>	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n-3</i>	<i>p_E</i> (SEM)	običajen		<i>n-3</i>
4,8-Di MeIQ	1	0	0	- (0)	0	0	- (0)	1 ^{cB}	2 ^{bA}	*** (0)
	5	0	0	- (0)	0	0	- (0)	6 ^{bA}	4 ^{aB}	*** (0)
	9	0	0	- (0)	0	0	- (0)	11 ^{aA}	1 ^{cB}	*** (0)
	<i>p_D</i> (SEM)	- (0)	- (0)		- (0)	- (0)		*** (0)	*** (0)	
7,8-DiMeIQ	1	3 ^{bB}	5 ^{bA}	*** (0)	1 ^{bB}	8 ^{bA}	*** (0)	3 ^{cB}	5 ^{bA}	*** (0)
	5	7 ^{aB}	10 ^{aA}	*** (0)	13 ^a	25 ^a	nz (6)	6 ^{bB}	8 ^{bA}	*(1)
	9	3 ^b	3 ^c	nz (0)	3 ^{bA}	0 ^{cB}	*** (0)	10 ^a	39 ^a	nz (16)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (0)	*** (0)		*** (5)	*** (1)		*** (0)	** (13)	
Glu-P-2	1	77 ^{bA}	59 ^{bB}	*** (3)	13 ^{bB}	73 ^{bA}	*** (3)	17 ^{cB}	20 ^{cA}	*(1)
	5	114 ^{aA}	73 ^{aB}	** (10)	60 ^a	101 ^a	nz (24)	76 ^{bA}	52 ^{aB}	*** (3)
	9	1 ^{cB}	1 ^{cA}	*** (0)	0 ^{bB}	16 ^{cA}	*** (1)	109 ^{aA}	42 ^{bB}	*** (7)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (8)	*** (2)		*** (20)	*** (2)		*** (6)	*** (1)	
harman	1	10 ^{cB}	32 ^{bA}	*** (1)	18 ^{bB}	42 ^{bA}	*** (2)	29 ^{aB}	33 ^{aA}	*(2)
	5	27 ^{aB}	72 ^{aA}	*** (0)	45 ^a	57 ^a	nz (7)	2 ^{cB}	4 ^{cA}	*(0)
	9	13 ^{bB}	23 ^{cA}	*** (1)	17 ^{bA}	6 ^{cB}	*** (1)	12 ^b	13 ^b	nz (2)
	<i>p_D</i> (SEM)	** (1)	*** (1)		*** (5)	*** (2)		*** (1)	*** (1)	
IQ	1	0	0	- (0)	1 ^{aA}	0 ^{aB}	*** (0)	6 ^a	5 ^a	nz (0)
	5	0	0	- (0)	1 ^a	0 ^a	nz (1)	0 ^{bA}	0 ^{bA}	- (0)
	9	0	0	- (0)	1 ^{aA}	0 ^{aB}	*** (0)	0 ^b	0 ^b	nz (0)
	<i>p_D</i> (SEM)	- (0)	- (0)		*** (1)	*** (0)		*** (0)	*** (0)	
MeIQ	1	117 ^{bA}	84 ^{bB}	** (5)	72 ^{bB}	90 ^{bA}	** (4)	91 ^{bA}	46 ^{bB}	*** (4)
	5	230 ^{aA}	187 ^{aB}	*** (3)	141 ^a	168 ^a	nz (15)	219 ^{aA}	87 ^{aB}	*** (8)
	9	84 ^{cA}	59 ^{cB}	** (4)	46 ^{cB}	97 ^{bA}	*** (4)	100 ^{bA}	84 ^{aB}	*(5)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (5)	*** (3)		*** (12)	*** (4)		*** (8)	*** (2)	
MeIQx	1	306 ^{bA}	74 ^{bB}	*** (11)	303 ^{aA}	66 ^{cB}	*** (11)	141 ^{cA}	93 ^{cB}	*** (6)
	5	350 ^{aA}	128 ^{aB}	*** (2)	227 ^a	126 ^a	nz (76)	393 ^b	343 ^b	nz (27)
	9	8 ^{cB}	27 ^{cA}	*** (1)	37 ^{bB}	74 ^{bA}	*** (3)	569 ^{aB}	952 ^{aA}	*** (17)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (9)	*** (2)		*** (62)	*** (3)		*** (18)	*** (19)	
norharman	1	14 ^c	14 ^c	nz (1)	11 ^{cB}	15 ^A	** (1)	41 ^c	46 ^b	nz (2)
	5	39 ^{aB}	41 ^{aA}	** (0)	42 ^a	41	nz (2)	112 ^{bB}	135 ^{aA}	** (4)
	9	19 ^{bA}	16 ^{bB}	*(1)	32 ^{bB}	36 ^A	*(2)	186 ^{aA}	16 ^{cB}	*** (6)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (1)	*** (1)		*** (2)	nz (1)		*** (6)	*** (1)	
PhIP	1	38 ^{cB}	76 ^{bA}	*** (3)	75 ^b	68 ^c	nz (4)	849 ^c	920 ^c	nz (44)
	5	96 ^{aB}	190 ^{aA}	*** (1)	144 ^a	173 ^a	nz (17)	2450 ^b	2481 ^a	nz (93)
	9	45 ^{bB}	68 ^{cA}	*** (3)	42 ^{cB}	147 ^{bA}	*** (5)	3518 ^{aA}	1914 ^{bB}	*** (129)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (2)	*** (3)		*** (14)	*** (5)		*** (128)	*** (40)	
Vsota HAA	1	566 ^{bA}	344 ^{bB}	*** (23)	497 ^{bA}	364 ^{bB}	** (22)	1196 ^c	1177 ^c	nz (59)
	5	867 ^{aA}	709 ^{aB}	*** (3)	675 ^a	691 ^a	nz (11)	3264 ^b	3114 ^a	nz (129)
	9	175 ^{cB}	203 ^{cA}	*(9)	180 ^{cB}	377 ^{bA}	*** (15)	4516 ^{aA}	3061 ^{bB}	*** (124)
	<i>p_D</i> (SEM)	*** (17)	*** (12)		*** (18)	*** (15)		*** (143)	*** (58)	

značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz - $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_E*, statistična verjetnost vpliva *n-3*–obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n-3*–obogatjenimi mini fileji); *p_D*, statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz - $p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_E*, statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A,B}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between control and *n-3*–enriched inner fillets); *p_D*, statistical probability of storage time effect; means with a different superscript within columns (^{a,b,c}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between times of storage)

Priloga C.13: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR) in nosilca (kontrola, olje, škrob in sol) ekstrakta brinovih jagod na vsebnost posameznih in skupnih HAA (ng/kg) v običajnih in *n*-3-obogatenih piščančjih mini filejih, pakiranih v modificirano atmosfero, po enem dnevu skladiščenja pri temperaturi (4 ±1) °C

Annex C.13: Effects of type of thermal treatment (two-platted grill, oven and IR oven) and juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on content of HAA (ng kg⁻¹) in chicken inner filets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n*-3 enriched) and without (control), after 1 day of storing in modified atmosphere and at temperature of (4 ±1) °C

Obogatitev običajen						<i>n</i> -3					
1. dan	TO/nosilec	kontrola	olje	škrob	sol	p_N (SEM)	kontrola	olje	škrob	sol	p_N (SEM)
4,8-DiMeIQ	IR	0	0 ^B	0 ^B	0 ^C	-(0)	0 ^B	0 ^B	0	0 ^B	-(0)
	pečica	0	0 ^B	0 ^B	0 ^B	-(0)	0 ^B	0 ^B	0	0 ^B	-(0)
	žar	0 ^d	3 ^{aA}	1 ^{cA}	1 ^{bA}	*** (0)	4 ^{aA}	1 ^{cA}	0 ^d	2 ^{bA}	*** (0)
	p_{TO} (SEM)	-(0)	*** (0)	*** (0)	*** (0)		*** (0)	*** (0)	-(0)	*** (0)	
7,8-DiMeIQ	IR	6 ^{aB}	5 ^{bB}	3 ^{cB}	3 ^{cA}	*** (0)	1 ^{dC}	2 ^{bC}	1 ^{cB}	5 ^{aB}	*** (0)
	pečica	2 ^{bC}	6 ^{aA}	6 ^{aA}	1 ^{cC}	*** (0)	7 ^{bA}	6 ^{bA}	0 ^{cC}	8 ^{aA}	*** (0)
	žar	7 ^{aA}	4 ^{cC}	6 ^{bA}	3 ^{dB}	*** (0)	6 ^{bB}	4 ^{dB}	6 ^{aA}	5 ^{cB}	*** (0)
	p_{TO} (SEM)	*** (0)	*** (0)	*** (0)	*** (0)		*** (0)	*** (0)	*** (0)	*** (0)	
Glu-P2	IR	52 ^{cB}	30 ^{dA}	61 ^{bBA}	77 ^{aA}	*** (3)	23 ^{BB}	17 ^{cC}	0 ^{dB}	59 ^{aB}	*** (2)
	pečica	11 ^{bC}	0 ^{cC}	57 ^{aB}	13 ^{bB}	*** (1)	100 ^{aA}	80 ^{bA}	0 ^{dB}	73 ^{cA}	*** (4)
	žar	83 ^{aA}	12 ^{dB}	67 ^{bA}	17 ^{cB}	*** (3)	0 ^{dC}	53 ^{BB}	71 ^{aA}	20 ^{cC}	*** (2)
	p_{TO} (SEM)	*** (3)	*** (1)	*** (3)	*** (2)		*** (3)	*** (3)	*** (2)	*** (3)	
harman	IR	32 ^{aA}	8 ^{cB}	18 ^{bC}	10 ^{cC}	*** (1)	6 ^{dC}	16 ^{bC}	13 ^{cB}	32 ^{aB}	*** (1)
	pečica	13 ^{cB}	9 ^{dB}	41 ^{aA}	18 ^{bB}	*** (1)	24 ^{BB}	25 ^{BB}	12 ^{cB}	42 ^{aA}	*** (1)
	žar	34 ^{aA}	25 ^{cA}	33 ^{aB}	29 ^{bA}	*** (2)	29 ^{dA}	38 ^{bA}	46 ^{aA}	33 ^{cB}	*** (2)
	p_{TO} (SEM)	*** (1)	*** (1)	*** (2)	*** (1)		*** (1)	*** (1)	*** (1)	*** (2)	
IQ	IR	0 ^{BB}	0 ^{BA}	0 ^{BA}	0 ^{AC}	*** (0)	1 ^{aA}	0 ^{BA}	0 ^{BA}	0 ^{BB}	*** (0)
	pečica	6 ^{aA}	0 ^{cA}	0 ^{cA}	1 ^{bB}	*** (0)	0 ^B	0 ^A	0 ^A	0 ^B	-(0)
	žar	0 ^{BB}	0 ^{BA}	0 ^{BA}	6 ^{aA}	*** (0)	0 ^{BB}	0 ^{BA}	0 ^{BA}	5 ^{aA}	*** (0)
	p_{TO} (SEM)	*** (0)	;(0)	;(0)	*** (0)		*** (0)	;(0)	;(0)	*** (0)	
MeIQ	IR	69 ^{BB}	55 ^{cA}	77 ^{bC}	117 ^{aA}	*** (4)	35 ^{dC}	49 ^{cC}	91 ^{aA}	84 ^{bA}	*** (3)
	pečica	49 ^{dC}	59 ^{cA}	89 ^{aB}	72 ^{bC}	*** (3)	66 ^{cB}	104 ^{aB}	29 ^{dB}	90 ^{bA}	*** (4)
	žar	156 ^{aA}	42 ^{dB}	113 ^{bA}	91 ^{cB}	*** (5)	77 ^{cA}	114 ^{aA}	96 ^{bA}	46 ^{dB}	*** (4)
	p_{TO} (SEM)	*** (5)	*** (3)	*** (5)	*** (5)		*** (3)	*** (5)	*** (4)	*** (4)	
MeIQx	IR	108 ^{cC}	780 ^{aA}	57 ^{dB}	306 ^{bA}	*** (21)	94 ^{bC}	1200 ^{aA}	104 ^{bA}	74 ^{BB}	*** (30)
	pečica	131 ^{cB}	414 ^{aB}	25 ^{dC}	303 ^{bA}	*** (13)	133 ^{BB}	327 ^{aB}	58 ^{cB}	66 ^{cC}	*** (9)
	žar	153 ^{bA}	251 ^{aC}	112 ^{cA}	141 ^{bB}	*** (9)	147 ^{aA}	157 ^{aC}	105 ^{bA}	93 ^{bA}	*** (6)
	p_{TO} (SEM)	*** (7)	*** (27)	*** (4)	*** (13)		*** (6)	*** (36)	*** (5)	*** (4)	
norharman	IR	10 ^{BB}	0 ^{dB}	8 ^{cC}	14 ^{dB}	*** (0)	19 ^{aB}	0 ^{cB}	0 ^{cC}	14 ^{BB}	*** (1)
	pečica	0 ^{cC}	0 ^{cB}	16 ^{aB}	11 ^{bC}	*** (0)	18 ^{aB}	0 ^{cB}	17 ^{aB}	15 ^{bB}	*** (1)
	žar	15 ^{cA}	31 ^{bA}	39 ^{aA}	41 ^{aA}	*** (2)	44 ^{aA}	31 ^{cA}	38 ^{bA}	46 ^{aA}	*** (2)
	p_{TO} (SEM)	*** (1)	*** (1)	*** (1)	*** (1)		*** (1)	*** (1)	*** (1)	*** (1)	
PhIP	IR	78 ^{BB}	128 ^{aB}	16 ^{dC}	38 ^{cB}	*** (4)	52 ^{cB}	76 ^{BB}	107 ^{aB}	76 ^{BB}	*** (4)
	pečica	43 ^{cC}	49 ^{bC}	70 ^{aB}	75 ^{aB}	*** (3)	93 ^{aB}	87 ^{aB}	33 ^{cC}	68 ^{BB}	*** (4)
	žar	229 ^{cA}	773 ^{bA}	760 ^{bA}	849 ^{aA}	*** (35)	1008 ^{aA}	577 ^{cA}	608 ^{cA}	920 ^{bA}	*** (40)
	p_{TO} (SEM)	*** (7)	*** (23)	*** (22)	*** (25)		*** (29)	*** (17)	*** (18)	*** (27)	
vsota	IR	356 ^{cB}	1006 ^{aB}	244 ^{dB}	566 ^{BB}	*** (31)	234 ^{cC}	1362 ^{aA}	321 ^{BB}	344 ^{BB}	*** (36)
	pečica	258 ^{dC}	537 ^{aC}	305 ^{cB}	497 ^{BB}	*** (21)	443 ^{BB}	630 ^{aC}	150 ^{dC}	364 ^{cB}	*** (22)
	žar	696 ^{bA}	1150 ^{aA}	1135 ^{aA}	1196 ^{aA}	*** (53)	1315 ^{aA}	975 ^{cB}	973 ^{aA}	1177 ^{bA}	*** (56)
	p_{TO} (SEM)	*** (24)	*** (47)	*** (35)	*** (41)		*** (41)	*** (52)	*** (30)	*** (37)	

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, $nz - p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_N , statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod); p_{TO} , statistična verjetnost vpliva načina toplotne obdelave; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b, c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med načini toplotne obdelave)

without - carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, $nz - p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_N , statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between different juniper berries extract carriers); p_{TO} , statistical probability of type of thermal treatment effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (^{a, b, c}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of differences between different types of thermal treatment)

Priloga C.14: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR) in nosilca (kontrola, olje, škrob in sol) ekstrakta brinovih jagod na vsebnost posameznih in skupnih HAA (ng/kg) v običajnih in *n*-3-obogatenih piščančjih mini filejih, pakiranih v modificirano atmosfero, po petih dneh skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C

Annex C.14: Effects of type of thermal treatment (two-platted grill, oven and IR oven) and junper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on content of HAA (ng kg⁻¹) in chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n*-3 enriched) and without (control), after 5 days of storing in modified atmosphere and at temperature of (4 ± 1) °C

5.dan	Obogatitev običajen					<i>n</i> -3					
	TO/nosilec	kontrola	olje	škrob	sol	<i>p</i> _N (SEM)	kontrola	olje	škrob	sol	<i>p</i> _N (SEM)
4,8-DiMeIQ	IR	0 ^{bC}	1 ^{aB}	0 ^{bB}	0 ^{bB}	*** (0)	0 ^{aC}	0 ^{aB}	0 ^{aB}	0 ^{aC}	nz(0)
	pečica	0 ^{aB}	0 ^{bB}	0 ^{bB}	0 ^{aB}	*** (0)	0 ^{aB}	0 ^{bB}	0 ^{bB}	0 ^{aB}	** (0)
	žar	3 ^{bA}	6 ^{aA}	4 ^{bA}	6 ^{aA}	** (1)	1 ^{cA}	3 ^{bA}	3 ^{bA}	4 ^{aA}	*** (0)
	<i>p</i> _{TO} (SEM)	*** (0)	*** (1)	*** (0)	*** (0)		*** (0)	*** (0)	*** (0)	*** (0)	
7,8-DiMeIQ	IR	7 ^b	25 ^{aA}	0 ^{bC}	7 ^b	** (6)	0 ^{cC}	1 ^{bC}	0 ^{cB}	10 ^{aB}	*** (0)
	pečica	3	11 ^B	10 ^A	13	nz(4)	2 ^{cB}	12 ^{bA}	1 ^{cB}	25 ^{aA}	*** (1)
	žar	5	6 ^B	6 ^B	6	nz(0)	5 ^{bA}	7 ^{aB}	4 ^{bA}	8 ^{aB}	** (1)
	<i>p</i> _{TO} (SEM)	nz(4)	*(5)	*** (0)	nz(5)		*** (0)	*** (0)	** (1)	*** (1)	
Glu-P2	IR	77 ^{bA}	43 ^{cA}	79 ^{bA}	114 ^{aA}	*** (7)	28 ^{bA}	7 ^{dC}	11 ^{cB}	73 ^{aB}	*** (1)
	pečica	23 ^{bC}	11 ^{bB}	72 ^{aB}	60 ^{aB}	** (17)	11 ^{cB}	121 ^{aA}	7 ^{cC}	101 ^{bA}	*** (2)
	žar	48 ^{cB}	46 ^{cA}	55 ^{bC}	76 ^{aBA}	*** (3)	27 ^{dA}	46 ^{bB}	34 ^{cA}	52 ^{aC}	*** (1)
	<i>p</i> _{TO} (SEM)	*** (2)	*** (2)	*** (3)	nz(22)		*** (1)	*** (3)	*** (0)	*** (1)	
harman	IR	45 ^{aA}	13 ^{cB}	27 ^{bB}	27 ^{bB}	*** (0)	7 ^{cA}	3 ^{dC}	17 ^{bA}	72 ^{aA}	*** (1)
	pečica	21 ^{cC}	19 ^{cA}	59 ^{aA}	45 ^{bA}	*** (5)	4 ^{dB}	54 ^{bA}	17 ^{cA}	57 ^{aB}	*** (1)
	žar	42 ^{aB}	6 ^{bC}	8 ^{bC}	2 ^{cC}	*** (1)	3 ^{bB}	5 ^{abB}	6 ^{aB}	4 ^{bC}	*(1)
	<i>p</i> _{TO} (SEM)	*** (1)	*** (1)	*** (3)	*** (5)		** (1)	*** (1)	*** (1)	*** (1)	
IQ	IR	0	0	0	0	-(0)	0	0	0	0	-(0)
	pečica	0	0	0	0	-(0)	0	0	0	0	-(0)
	žar	0	0	0	0	-(0)	0	0	0	0	-(0)
	<i>p</i> _{TO} (SEM)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)		-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	
MeIQ	IR	116 ^{cA}	85 ^d	136 ^{bA}	230 ^{aA}	*** (4)	83 ^{cA}	37 ^{dC}	119 ^{bA}	187 ^{aA}	*** (6)
	pečica	89 ^{cC}	98 ^{cb}	113 ^{BB}	141 ^{aB}	** (11)	31 ^{dC}	227 ^{aA}	71 ^{cB}	168 ^{bB}	*** (2)
	žar	104 ^{bB}	94 ^b	85 ^{bC}	219 ^{aA}	*** (10)	59 ^{bB}	96 ^{aB}	39 ^{cC}	87 ^{aC}	*** (5)
	<i>p</i> _{TO} (SEM)	** (5)	nz(8)	*** (2)	*** (14)		*** (2)	*** (7)	*** (5)	*** (1)	
MeIQx	IR	164 ^c	962 ^{aA}	100 ^{dB}	350 ^{bBA}	*** (18)	80 ^{bB}	84 ^{bC}	128 ^{aB}	128 ^{aB}	*** (2)
	pečica	187 ^b	516 ^{aB}	59 ^{cC}	227 ^{bB}	*** (54)	54 ^{dC}	455 ^{aA}	82 ^{cB}	126 ^{bB}	*** (4)
	žar	172 ^c	354 ^{aC}	256 ^{bA}	393 ^{aA}	*** (24)	147 ^{cA}	324 ^{aB}	234 ^{bA}	343 ^{aA}	*** (31)
	<i>p</i> _{TO} (SEM)	nz(12)	*** (30)	*** (9)	*(63)		*** (6)	*** (13)	** (27)	*** (19)	
norharman	IR	25 ^{cB}	16 ^{dB}	37 ^{bB}	39 ^{aB}	*** (1)	31 ^{bB}	23 ^{cB}	16 ^{dC}	41 ^{aB}	*** (1)
	pečica	11 ^{dC}	16 ^{cB}	35 ^{bB}	42 ^{aB}	*** (2)	25 ^{cC}	18 ^{dC}	36 ^{bB}	41 ^{aB}	*** (1)
	žar	50 ^{bA}	106 ^{aA}	115 ^{aA}	112 ^{aA}	*** (5)	60 ^{cA}	109 ^{bA}	104 ^{bA}	135 ^{aA}	*** (4)
	<i>p</i> _{TO} (SEM)	*** (2)	*** (3)	*** (4)	*** (4)		*** (2)	*** (2)	*** (4)	*** (0)	
PhIP	IR	170 ^{aB}	193 ^{aB}	36 ^{cB}	96 ^{bB}	*** (25)	58 ^{cC}	70 ^{cC}	129 ^{bB}	190 ^{aB}	*** (9)
	pečica	73 ^{cC}	116 ^{bC}	112 ^{bB}	144 ^{aB}	*** (12)	191 ^{bB}	206 ^{aB}	68 ^{dC}	173 ^{cB}	*** (2)
	žar	1167 ^{cA}	2080 ^{bA}	2139 ^{bA}	2450 ^{aA}	*** (87)	1084 ^{dA}	2173 ^{bA}	1586 ^{cA}	2481 ^{aA}	*** (39)
	<i>p</i> _{TO} (SEM)	*** (44)	*** (11)	*** (62)	*** (72)		*** (31)	*** (12)	*** (16)	*** (27)	
vsota	IR	604 ^{cB}	1341 ^{aB}	425 ^{dB}	867 ^{bB}	*** (35)	286 ^{cB}	224 ^{dC}	429 ^{bB}	709 ^{aB}	*** (4)
	pečica	418 ^{dC}	789 ^{aC}	468 ^{cB}	675 ^{bC}	*** (14)	323 ^{cB}	1096 ^{aB}	282 ^{dC}	691 ^{bB}	*** (8)
	žar	1594 ^{cA}	2700 ^{bA}	2687 ^{bA}	3264 ^{aA}	*** (116)	1389 ^{dA}	2764 ^{bA}	2011 ^{cA}	3114 ^{aA}	*** (66)
	<i>p</i> _{TO} (SEM)	*** (60)	*** (35)	*** (78)	*** (95)		*** (41)	*** (19)	*** (41)	*** (48)	

Legenda: glej prilogo C.13; legend: see annex C.13

Priloga C.15: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR) in nosilca (kontrola, olje, škrob in sol) ekstrakta brinovih jagod na vsebnost posameznih in skupnih HAA (ng/kg) v običajnih in *n*-3-obogatenih piščančjih mini filejih, pakiranih v modificirano atmosfero, po devetdnevnem skladiščenju pri temperaturi (4 ± 1) °C

Annex C.15: Effects of type of thermal treatment (two-platted grill, oven and IR oven) and juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on content of HAA (ng kg⁻¹) in chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n*-3 enriched) and without (control), after 9 days of storing in modified atmosphere and at temperature of (4 ± 1) °C

9.dan	obogatitev običajen				<i>p_N</i> (SEM)	<i>n</i> -3				
	TO/nosilec	kontrola	olje	škrob		sol	kontrola	olje	škrob	sol
4,8-Di MeIQ	IR	0 ^{BB}	1 ^{AB}	0 ^{BB}	0 ^{BB}	0 ^C	0	0 ^B	0 ^C	nz(0)
	pečica	0 ^{AB}	0 ^C	0 ^{CB}	0 ^{BB}	2 ^{AB}	0 ^C	0 ^{CB}	0 ^{BB}	*** (0)
	žar	7 ^{BA}	7 ^{BA}	11 ^{AA}	11 ^{AA}	6 ^{AA}	2 ^{ab}	7 ^{AA}	1 ^{BA}	*(2)
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	*** (1)	*** (0)	*** (1)	*** (0)	*** (1)	nz (1)	*(2)	*** (0)	
7,8-DiMeIQ	IR	0 ^{BB}	0 ^{BC}	0 ^{BC}	3 ^{AB}	0 ^{CC}	0 ^{BC}	0 ^{CB}	3 ^{AB}	*** (0)
	pečica	1 ^{CB}	5 ^{AB}	3 ^{BB}	3 ^{BB}	4 ^{AB}	4 ^{AB}	2 ^{BB}	0 ^{CB}	*** (0)
	žar	7 ^{BA}	6 ^{BA}	9 ^{AA}	10 ^{AA}	7 ^{BA}	8 ^{BA}	9 ^{BA}	39 ^{AA}	*(11)
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	*** (1)	*** (0)	*** (0)	*** (0)	*** (0)	*** (0)	*** (1)	*(13)	
Glu-P-2	IR	9 ^{BB}	12 ^{AC}	11 ^{AB}	1 ^{CB}	19 ^{AB}	5 ^{BB}	21 ^{AB}	1 ^{CC}	*** (1)
	pečica	8 ^{BB}	16 ^{AB}	5 ^{BB}	0 ^{CB}	18 ^{AB}	1 ^{DC}	10 ^{CB}	16 ^{BB}	*** (1)
	žar	64 ^{BA}	56 ^{BA}	96 ^{AA}	109 ^{AA}	43 ^{BA}	71 ^{AA}	69 ^{AA}	42 ^{BA}	** (10)
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	*** (3)	*** (2)	*** (6)	*** (5)	*** (2)	*** (1)	*** (11)	*** (0)	
harman	IR	4 ^{BB}	4 ^{BB}	4 ^{BB}	13 ^{AB}	4 ^B	4 ^{BB}	4 ^B	23 ^{AA}	*** (1)
	pečica	3 ^{BB}	1 ^{CB}	3 ^{BB}	17 ^{AA}	3 ^C	19 ^{AA}	3 ^C	6 ^{BC}	*** (1)
	žar	8 ^{CB}	61 ^{AA}	7 ^{CA}	12 ^{BB}	4 ^B	3 ^{BB}	6 ^B	13 ^{AB}	** (2)
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	*(2)	*** (2)	*** (1)	** (1)	nz (1)	*** (2)	nz (2)	*** (1)	
IQ	IR	0 ^{AA}	0 ^{AB}	0 ^A	0 ^{AB}	0	0	0	0	-(0)
	pečica	0 ^{CA}	0 ^{CB}	1 ^B	1 ^{AA}	0	0	0	0	-(0)
	žar	0 ^{BA}	1 ^{AA}	0 ^B	0 ^{BB}	0	0	0	0	-(0)
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	-(0)	*** (0)	nz (0)	*** (0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	
MeIQ	IR	38 ^{CB}	32 ^{CC}	59 ^{BB}	84 ^{AB}	84 ^{AA}	11 ^{DC}	45 ^{CB}	59 ^{BC}	*** (3)
	pečica	28 ^{BB}	45 ^{AB}	22 ^{BC}	46 ^{AC}	56 ^{CB}	84 ^{BB}	50 ^{CB}	97 ^{AA}	*** (4)
	žar	473 ^{AA}	135 ^{BA}	154 ^{BA}	100 ^{BA}	53 ^{CB}	114 ^{AA}	79 ^{BA}	84 ^{BB}	*** (9)
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	** (129)	*** (4)	*** (5)	*** (5)	*** (3)	*** (4)	** (10)	*** (4)	
MeIQx	IR	36 ^{BB}	119 ^{AB}	42 ^{BB}	8 ^{BC}	25 ^{CB}	58 ^{AC}	33 ^{BB}	27 ^{CC}	*** (3)
	pečica	58 ^B	68 ^B	47 ^B	37 ^B	76 ^{AB}	73 ^{AB}	16 ^{BB}	74 ^{AB}	*** (3)
	žar	416 ^{BA}	256 ^{CA}	585 ^{AA}	569 ^{AA}	315 ^{CA}	341 ^{CA}	487 ^{BA}	952 ^{AA}	*** (40)
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	*** (38)	*** (28)	*** (13)	*** (14)	*** (27)	*** (4)	*** (38)	*** (2)	
norharman	IR	15 ^{CB}	23 ^{BB}	35 ^{AB}	19 ^{CC}	26 ^{AB}	24 ^{AB}	29 ^{AB}	16 ^{BB}	** (3)
	pečica	15 ^{CB}	22 ^{BB}	25 ^{BB}	32 ^{AB}	31 ^{BB}	13 ^{DC}	21 ^{CB}	36 ^{AA}	*** (1)
	žar	163 ^{BA}	105 ^{CA}	254 ^{AA}	186 ^{BA}	123 ^{CA}	143 ^{BA}	171 ^{AA}	16 ^{DB}	*** (9)
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	*** (0)	*** (4)	*** (14)	*** (5)	*** (5)	*** (4)	*** (9)	*** (1)	
PhIP	IR	99 ^B	70 ^B	21 ^B	45 ^B	34 ^{BC}	40 ^{BB}	18 ^{CB}	68 ^{AC}	*** (5)
	pečica	29 ^{DB}	83 ^{AB}	54 ^{BB}	42 ^{CB}	285 ^{AB}	83 ^{CB}	39 ^{DB}	147 ^{BB}	*** (8)
	žar	2829 ^{CA}	2036 ^{DA}	3913 ^{AA}	3518 ^{BA}	2230 ^{BA}	2373 ^{BA}	2661 ^{AA}	1914 ^{CA}	*** (14)
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	*** (41)	*** (59)	*** (49)	*** (104)	*** (91)	*** (23)	*** (64)	*** (50)	
vsota	IR	202 ^B	265 ^B	178 ^B	175 ^B	191 ^{AC}	158 ^{BC}	156 ^{BB}	203 ^{AC}	*** (9)
	pečica	147 ^{CB}	241 ^{AB}	167 ^{BB}	180 ^{BB}	476 ^{AB}	280 ^{CB}	141 ^{DB}	377 ^{BB}	*** (17)
	žar	3968 ^{CA}	2668 ^{DA}	5032 ^{AA}	4516 ^{BA}	2782 ^{CA}	3055 ^{BA}	3491 ^{AA}	3061 ^{BA}	*** (39)
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	*** (171)	*** (86)	*** (61)	*** (102)	*** (128)	*** (30)	*** (101)	*** (134)	

Legenda: glej prilogo C.13; legend: see annex C.13

Priloga C.16: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR) in nosilca (kontrola, olje, škrob in sol) ekstrakta brinovih jagod na izgubo mase (%) toplotno obdelanih običajnih in *n*-3-obogatenih piščančjih mini filejev po devetdnevnem skladiščenju pri temperaturi (4 ±1) °C

Annex C.16: Effects of type of thermal treatment (two-platted grill, oven and IR oven) and plant extract carrier (without, oil, starch and salt) C on weight loss (%) after thermal treatment of chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n*-3 enriched) and without (control), after 9 days of storing in modified atmosphere and at (4 ±1) °C

dan	TO/nosilec	Obogatitev običajen					<i>p_N</i> (SEM)	<i>n</i> -3				
		kontrola	olje	škrob	sol			kontrola	olje	škrob	sol	<i>p_N</i> (SEM)
1	IR	33,1	29,1	31,2	35,9	-	37,7	34,3	32,1	33,9	-	
	pečica	32,5	35,9	34,7	33,1	-	34,5	34,0	35,3	38,9	-	
	žar	25,5	28,1	32,3	30,8	-	37,5	29,9	31,4	35,5	-	
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	IR	35,8	34,8	36,0	32,9	-	34,9	28,4	34,3	36,3	-	
	pečica	36,5	34,3	34,8	37,6	-	10,3	32,3	37,3	39,0	-	
	žar	26,6	26,6	24,8	28,5	-	25,6	25,7	27,0	32,0	-	
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	IR	34,2	37,0	19,4	34,7	-	36,8	39,4	40,7	39,8	-	
	pečica	34,4	35,6	36,1	34,8	-	42,1	38,8	36,3	43,9	-	
	žar	27,8	27,3	29,6	33,1	-	31,3	27,1	32,2	29,6	-	
	<i>p_{TO}</i> (SEM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez brinovega ekstrakta; SEM, standardna napaka povprečja; *p_N*, statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod); *p_{TO}*, statistična verjetnost vpliva načina toplotne obdelave; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b, c}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med različnimi načini toplotne obdelave)

without - carriers (oil, starch, salt) without extract; SEM, standard error of mean; *p_N*, statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D}) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of differences between different juniper berries extract carriers); *p_{TO}*, statistical probability of types of thermal treatment; means with a different superscript within columns (^{a, b, c}) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of differences between different types of thermal treatment)

Priloga C.17: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n-3*–obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ± 1) °C na senzorične lastnosti v modificirano atmosfero pakiranih mariniranih piščančjih mini filejev po pečenju na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR

Annex C.17: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n-3* enriched) and storage time at temperature of (4 ± 1) °C in modified atmosphere on sensory properties marinated chicken inner fillets after thermal treatment at two-plated grill, oven and IR oven

Nosilec	Parameter	TO			IR			pečica			žar		
		Dan/obogatitev	običajen <i>n-3</i>	p_E (SEM)	običajen <i>n-3</i>	p_E (SEM)	običajen <i>n-3</i>	p_E (SEM)	običajen <i>n-3</i>	p_E (SEM)	običajen <i>n-3</i>	p_E (SEM)	
kontrola	tuji vonji	1	1,0	1,0	-(0)	1,0 ^b	1,2	nz(0,2)	1,0	1,0	-(0)		
		5	1,3	1,0	nz(0,2)	2,0 ^a	1,8	nz(0,1)	1,0	1,0	-(0)		
		9	1,0	1,3	nz(0,2)	1,0 ^b	1,5	nz(0,4)	1,0	1,3	nz(0,2)		
		p_D (SEM)	nz(0,1)	nz(0,1)		*** (0)	nz(0,4)		-(0)	nz(0,1)			
žarkost		1	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0 ^b	-(0)	1,0	1,0	-(0)		
		5	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0 ^b	-(0)	1,0	1,0	-(0)		
		9	1,0	1,3	nz(0,2)	1,0	1,8 ^a	*** (0,2)	1,0	1,0	-(0)		
		p_D (SEM)	-(0)	nz(0,1)		-(0)	*** (0,1)		-(0)	-(0)			
WOF		1	1,0 ^b	1,0 ^b	-(0)	1,0 ^b	1,0 ^b	-(0)	1,0	1,0	-(0)		
		5	1,5 ^a	1,3 ^b	nz(0,2)	1,3 ^b	1,3 ^b	nz(0,3)	1,0	1,0	-(0)		
		9	1,8 ^a	1,8 ^a	nz(0,3)	2,5 ^a	2,5 ^a	-(0)	1,0	1,0	-(0)		
		p_D (SEM)	** (0,1)	*(0,2)		*** (0,1)	*** (0,1)		-(0)	(0)			
tuje arome		1	1,2 ^b	1,0	nz(0,2)	1,0	1,2 ^b	nz(0,2)	1,0	1,0	-(0)		
		5	1,8 ^a	1,0	** (0,2)	1,5	1,8 ^a	nz(0,4)	1,0	1,0	-(0)		
		9	1,0 ^b	1,3	nz(0,2)	1,5	1,5 ^{ab}	-(0)	1,0	1,0	-(0)		
		p_D (SEM)	*(0,2)	nz(0,1)		nz(0,3)	*(0,2)		-(0)	(0)			
olje	tuji vonji	1	1,8 ^a	1,5	nz(0,4)	1,7	1,5	nz(0,1)	1,5	1,2	nz(0,6)		
		5	2,0 ^a	2,0	-(0)	1,0 ^B	1,5 ^A	*** (0)	2,0 ^A	1,5 ^B	*** (0)		
		9	1,5 ^b	1,5	-(0)	1,5	1,5	nz(0,90)	2,0 ^A	1,5 ^B	*** (0)		
		p_D (SEM)	*(0,2)	nz(0,3)		nz(0,3)	nz(0)		nz(0,5)	nz(0,2)			
žarkost		1	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0 ^b	-(0)	1,0	1,0	-(0)		
		5	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0 ^b	-(0)	1,0	1,0	-(0)		
		9	1,0	1,0	-(0)	1,0	2,0 ^a	*** (0)	1,3	1,0	nz(0,2)		
		p_D (SEM)	-(0)	-(0)		-(0)	*** (0)		nz(0,1)	-(0)			
WOF		1	1,0 ^b	1,0 ^b	-(0)	1,0 ^b	1,0	-(0)	1,0	1,0 ^b	-(0)		
		5	1,3 ^{ab}	2,3 ^a	** (0,3)	1,3 ^b	1,5	nz(0,2)	1,0	1,0 ^b	-(0)		
		9	1,5 ^a	1,3 ^b		2,0 ^a	1,5	nz(0,4)	1,3 ^B	2,5 ^{AA}	** (0,2)		
		p_D (SEM)	*(0,1)	*** (0,2)		*** (0,1)	nz(0,3)		nz(0,1)	*** (0)			
tuje arome		1	4,7 ^{AA}	4,2 ^{AB}	nz(0,3)	5,0 ^{AA}	2,3 ^{CB}	*(0,6)	4,3 ^{AA}	3,5 ^B	** (0,2)		
		5	4,0 ^b	3,0 ^b	nz(0,5)	3,5 ^{BB}	4,5 ^{AA}	*** (0)	3,8 ^{ab}	3,5	nz(0,6)		
		9	3,5 ^b	3,0 ^b	nz(0,2)	2,0 ^b	3,3 ^b	nz(0,2)	3,3 ^b	3,0	nz(0,2)		
		p_D (SEM)	*(0,3)	*** (0,3)		*** (0,3)	*** (0,4)		nz(0,5)	nz(0,3)			
škrob	tuji vonji	1	1,2	1,2	nz(0,3)	1,2 ^c	1,2	nz(0,3)	1,2	1,0	nz(0,2)		
		5	1,8	1,8	nz(0,3)	2,0 ^{AA}	1,5 ^B	*** (0)	1,3	1,0	nz(0,2)		
		9	1,3	1,3	nz(0,3)	1,5 ^b	1,5	-(0)	1,3	1,3	nz(0,3)		
		p_D (SEM)	nz(0,3)	nz(0,3)		** (0,2)	nz(0,2)		nz(0,3)	nz(0,1)			
žarkost		1	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)		
		5	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)		
		9	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)		
		p_D (SEM)	-(0)	-(0)		-(0)	-(0)		-(0)	-(0)			
WOF		1	1,0 ^c	1,0 ^b	-(0)	1,0 ^b	1,0 ^c	-(0)	1,0 ^b	1,0 ^b	-(0)		
		5	2,0 ^{AA}	1,5 ^{AB}	*** (0)	2,0 ^a	2,0 ^a	-(0)	2,3 ^{AA}	1,5 ^{AB}	** (0,2)		
		9	1,5 ^b	1,5 ^a	-(0)	2,5 ^a	1,5 ^b	*** (0)	1,0 ^b	1,0 ^b	-(0)		
		p_D (SEM)	*** (0)	*** (0)		*** (0)	*** (0)		*** (0,1)	*** (0)			
tuje arome		1	2,0	1,8	nz(0,4)	1,5 ^b	2,3 ^a	nz(0,5)	2,3	1,7	nz(0,6)		
		5	2,0	1,8	nz(0,4)	2,3 ^{AA}	1,5 ^{BB}	** (0,18)	2,0 ^A	1,0 ^B	*** (0)		
		9	2,0	1,8	nz(0,2)	2,0 ^{ab}	1,5 ^b	*** (0)	2,0 ^A	1,5 ^B	*** (0)		
		p_D (SEM)	nz(0,3)	nz(0,4)		nz(0,3)	*(0,3)		nz(0,2)	nz(0,4)			

Nadaljevanje priloge C.17: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3–obogatitev) in časa skladiščenja pri temperaturi (4 ±1) °C na senzorične lastnosti v modificirano atmosfero pakiranih mariniranih piščančjih mini filejev po pečenju na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR

Continuation of annex C.17: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and storage time at temperature of (4 ±1) °C in modified atmosphere on sensory properties marinated chicken inner fillets after thermal treatment at two-plated grill, oven and IR oven

Nosilec	Parameter	TO			IR			pečica			žar			
		Dan/obogatitev	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)	običajen	<i>n</i> -3	<i>p_E</i> (SEM)
sol	tuji vonji	1	1,0	1,0 ^b	-(0)	1,0 ^b	1,0 ^b	-(0)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)
		5	1,0 ^B	1,5 ^{aA}	*** (0)	2,0 ^a	1,5 ^a	nz(0,4)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)
		9	1,3	1,0 ^b	nz(0,2)	1,5 ^b	1,5 ^a	nz(0,2)	1,3	1,0	nz(0,2)	1,3	1,0	nz(0,2)
		<i>p_D</i> (SEM)	nz(0,14)	*** (0)		*(0,3)	*** (0)		nz(0,1)	-(0)		nz(0,1)	-(0)	
žarkost		1	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)
		5	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)
		9	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)
		<i>p_D</i> (SEM)	-(0)	-(0)		-(0)	-(0)		-(0)	-(0)		-(0)	-(0)	
WOF		1	1,0 ^b	1,0 ^b	-(0)	1,0 ^c	1,0 ^b	-(0)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)
		5	1,3 ^{ab}	1,8 ^a	nz(0,3)	2,0 ^{bb}	2,5 ^{aA}	** (0,2)	1,3	1,0	nz(0,2)	1,3	1,0	nz(0,2)
		9	1,5 ^{aA}	1,0 ^{bb}	*** (0)	2,5 ^a	2,0 ^a	nz(0,4)	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	-(0)
		<i>p_D</i> (SEM)	*(0,1)	*** (0,1)		*** (0)	*(0,3)		nz(0,1)	-(0)		nz(0,1)	-(0)	
tuje arome		1	1,5	1,7 ^a	nz(0,2)	1,7	1,2	nz(0,2)	1,7 ^b	1,3	nz(0,3)	1,7 ^b	1,3	nz(0,3)
		5	1,3	1,0 ^b	nz(0,2)	1,5	1,5	-(0)	2,0 ^{aA}	1,5 ^B	*** (0)	2,0 ^{aA}	1,5 ^B	*** (0)
		9	1,5 ^A	1,0 ^{bb}	*** (0)	1,8	1,5	nz(0,2)	1,5 ^b	1,5	-(0)	1,5 ^b	1,5	-(0)
		<i>p_D</i> (SEM)	nz(0,1)	** (0,2)		nz(0,2)	nz(0,2)		*(0,2)	nz(0,2)		*(0,2)	nz(0,2)	

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_E , statistična verjetnost vpliva *n*-3–obogatitev krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n*-3–obogatenimi mini fileji); p_D , statistična verjetnost vpliva časa skladiščenja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b, c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med časi skladiščenja)

without - carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_E , statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A, B}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between control and *n*-3–enriched muscles); p_D , statistical probability of storage time effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (^{a, b, c}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between times of storage)

Priloga C.18: Vpliv načina toplotne obdelave (na dvoploščnem žaru, pečici in pečici IR) in nosilca (kontrola, olje, škrob in sol) ekstrakta brinovih jagod na senzorične lastnosti toplotno obdelanih mariniranih običajnih in *n*-3-obogatenih mini filejev, pakiranih v modificirani atmosferi, med devetdnevni skladiščenjem pri temperaturi (4 ± 1) °C

Annex C.18: Effects of type of thermal treatment (two-platted grill, oven and IR oven) and juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on sensory properties after thermal treatment of marinated chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n*-3 enriched) and without (control), during 9 days at (4 ± 1) °C in modified atmosphere

Dan	Parameter	TO/nosilec	Obogatitev običajen				p_N (SEM)	<i>n</i> -3				p_N (SEM)
			kontrola	olje	škrob	sol		kontrola	olje	škrob	sol	
1	tuji vonji	IR	1,0 ^B	1,8 ^A	1,2 ^B	1,0 ^B	*** (0,2)	1,0	1,5	1,2	1,0	nz (0,3)
		pečica	1,0	1,7	1,2	1,0	nz (0,32)	1,2	1,5	1,2	1,0	nz (0,1)
		žar	1,0	1,5	1,2	1,0	nz (0,46)	1,0	1,2	1,0	1,0	nz (0,1)
		p_{TO} (SEM)	-(0)	nz (0,6)	nz (0,3)	-(0)		nz (0,2)	nz (0,4)	nz (0,2)	-(0)	
	žarkost	IR	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)
		pečica	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)
		žar	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)
		p_{TO} (SEM)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)		-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	
	WOF	IR	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)
		pečica	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)
		žar	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)
		p_{TO} (SEM)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)		-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	
tuje arome	IR	1,2 ^C	4,7 ^A	2,0 ^B	1,5 ^C	*** (0,2)	1,0 ^C	4,2 ^{AA}	1,8 ^B	1,7 ^B	*** (0,4)	
	pečica	1,0 ^B	5,0 ^A	1,5 ^B	1,7 ^B	*** (0,4)	1,2 ^B	2,3 ^{BA}	2,3 ^A	1,2 ^B	*(0,5)	
	žar	1,0 ^D	4,3 ^A	2,3 ^B	1,7 ^C	*** (0,3)	1,0 ^B	3,5 ^{AA}	1,7 ^B	1,3 ^B	*** (0,4)	
	p_{TO} (SEM)	nz (0,2)	nz (0,4)	nz (0,3)	nz (0,2)		nz (0,2)	** (0,4)	nz (0,6)	nz (0,3)		
5	tuji vonji	IR	1,3 ^{BB}	2,0 ^{AA}	1,8 ^{AA}	1,0 ^{BB}	*** (0,2)	1,0 ^{BD}	2,0 ^{AA}	1,8 ^{AB}	1,5 ^{AC}	*** (0,1)
		pečica	2,0 ^{AA}	1,0 ^{BB}	2,0 ^{AA}	2,0 ^{AA}	** (0,3)	1,8 ^a	1,5 ^b	1,5 ^a	1,5 ^a	nz (0,1)
		žar	1,0 ^{BC}	2,0 ^{AA}	1,3 ^{BB}	1,0 ^{BC}	*** (0,2)	1,0 ^{BB}	1,5 ^{BA}	1,0 ^{BB}	1,0 ^{BB}	*** (0)
		p_{TO} (SEM)	*** (0,1)	*** (0)	*(0,2)	** (0,3)		*** (0,1)	*** (0)	** (0,1)	*** (0)	
	žarkost	IR	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)
		pečica	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)
		žar	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)
		p_{TO} (SEM)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)		-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	
	WOF	IR	1,5 ^{AB}	1,3 ^B	2,0 ^A	1,3 ^{BB}	*** (0,2)	1,3 ^C	2,3 ^{AA}	1,5 ^{ABC}	1,8 ^{AB}	*** (0,2)
		pečica	1,3 ^{AB}	1,3 ^B	2,0 ^A	2,0 ^{AA}	*** (0,2)	1,3 ^B	1,5 ^b	2,0 ^{BAB}	1,3 ^{BB}	*** (0,2)
		žar	1,0 ^{BB}	1,0 ^B	2,3 ^A	1,3 ^{BB}	*** (0,2)	1,0 ^B	1,0 ^{CB}	1,5 ^{AA}	1,0 ^{BB}	*** (0)
		p_{TO} (SEM)	*(0,1)	nz (0,2)	nz (0,1)	** (0,2)		nz (0,2)	*** (0,1)	*** (0)	*(0,2)	
tuje arome	IR	1,8 ^B	4,0 ^A	2,0 ^B	1,3 ^{BB}	*** (0,4)	1,0 ^{BC}	3,0 ^{BA}	1,8 ^{AB}	1,0 ^{BC}	*** (0,3)	
	pečica	1,5 ^C	3,5 ^A	2,3 ^B	1,5 ^{BC}	*** (0,3)	1,8 ^{AB}	4,5 ^{AA}	1,5 ^{AC}	1,5 ^{AC}	*** (0,1)	
	žar	1,0 ^C	3,8 ^A	2,0 ^B	2,0 ^{AB}	*** (0,4)	1,0 ^{BC}	3,5 ^{BA}	1,0 ^{BC}	1,5 ^{AB}	*** (0,3)	
	p_{TO} (SEM)	nz (0,3)	nz (0,5)	nz (0,3)	** (0,1)		*** (0,1)	*(0,4)	** (0,1)	*** (0)		
9	tuji vonji	IR	1,0 ^B	1,5 ^{BA}	1,3 ^{AB}	1,3 ^{AB}	*(0,2)	1,3 ^{AB}	1,5 ^A	1,3 ^{AB}	1,0 ^{BB}	*(0,2)
		pečica	1,0 ^C	1,5 ^{BA}	1,5 ^A	1,3 ^B	** (0,1)	1,5	1,5	1,5	1,5 ^a	nz (0,3)
		žar	1,0 ^B	2,0 ^{AA}	1,3 ^B	1,3 ^B	*** (0,2)	1,3 ^{AB}	1,5 ^A	1,3 ^{AB}	1,0 ^{BB}	*(0,1)
		p_{TO} (SEM)	-(0)	*** (0)	nz (0,2)	nz (0,3)		nz (0,4)	-(0)	nz (0,2)	*** (0)	
	žarkost	IR	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,3 ^b	1,0 ^b	1,0	1,0	nz (0,1)
		pečica	1,0	1,0	1,0	1,0	-(0)	1,8 ^{AB}	2,0 ^{AA}	1,0 ^C	1,0 ^C	*** (0,1)
		žar	1,0	1,3	1,0	1,0	nz (0,2)	1,0 ^b	1,0 ^b	1,0	1,0	-(0)
		p_{TO} (SEM)	-(0)	nz (0,1)	-(0)	-(0)		*(0,2)	*** (0)	-(0)	-(0)	
	WOF	IR	1,8 ^b	1,5 ^b	1,5 ^b	1,5 ^b	nz (0,2)	1,8 ^{BA}	1,3 ^{BBC}	1,5 ^{AB}	1,0 ^{BC}	*** (0,2)
		pečica	2,5 ^{AA}	2,0 ^{AB}	2,0 ^{AB}	2,5 ^{AA}	*** (0)	2,5 ^{AA}	1,5 ^{BB}	1,5 ^{AB}	2,0 ^{AB}	*(0,4)
		žar	1,0 ^c	1,3 ^b	1,0 ^c	1,0 ^c	nz (0,1)	1,0 ^{CB}	2,5 ^{AA}	1,0 ^{BB}	1,0 ^{BB}	*** (0)
		p_{TO} (SEM)	*** (0,1)	** (0,1)	*** (0)	*** (0)		*** (0,1)	*** (0,3)	*** (0)	** (0,3)	
tuje arome	IR	1,0 ^{BD}	3,5 ^{AA}	2,0 ^B	1,5 ^C	*** (0)	1,3 ^{ABC}	3,0 ^A	1,8 ^B	1,0 ^{BC}	*** (0,2)	
	pečica	1,5 ^{AD}	3,0 ^{BA}	2,0 ^B	1,8 ^C	*** (0,1)	1,5 ^{AB}	3,3 ^A	1,5 ^B	1,5 ^{AB}	*** (0,1)	
	žar	1,0 ^{BD}	3,3 ^{AB}	2,0 ^B	1,5 ^C	*** (0,2)	1,0 ^{BC}	3,0 ^A	1,5 ^B	1,5 ^{AB}	*** (0)	
	p_{TO} (SEM)	*** (0)	*(0,1)	-(0)	nz (0,1)		*(0,1)	nz (0,1)	nz (0,1)	*** (0)		

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, $nz - p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_N , statistična verjetnost vpliva nosilca rastlinskega ekstrakta; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod); p_{TO} , statistična verjetnost

vpliva načina toplotne obdelave; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med načini toplotne obdelave)

without - carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, $nz - p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_N , statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A,B,C,D}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different plant extract carriers); p_{TO} , statistical probability of type of thermal treatment effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (^{a,b,c}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences

Priloga C.19: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3-obogatitev) in različnih nosilcev (kontrola, olje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na instrumentalno izmerjeno barvo in oksidacijo lipidov (TBK) na presnih ter senzorične lastnosti na dvoploščnem žaru pečenih (temperatura plošč 220 °C, 5 min) piščančjih mini filejev, pakiranih v vakuum po devetdnevem skladiščenju pri temperaturi (4 ±1) °C

Annex C.19: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and different juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on instrumental colour values and lipid oxidation (TBARs) of raw, as well as sensory properties after roasting chicken inner fillets on two-platted grill (plate temperature 220 °C, 5 min), on 9th day of storing at (4 ±1) °C and vacuum packed

Parameter	Obogatitev/nosilec	kontrola	olje	škrob	sol	p_N (SEM)
<i>L</i> *	običajen	52,83	55,04	52,17	56,92	$nz(3,51)$
	<i>n</i> -3	54,56	51,18	50,68	55,26	$nz(3,16)$
	p_E (SEM)	$nz(4,16)$	$nz(3,20)$	$nz(1,79)$	$nz(3,71)$	
<i>a</i> *	običajen	2,08	1,44 ^b	2,12 ^b	1,22 ^b	$nz(0,66)$
	<i>n</i> -3	2,37 ^C	3,45 ^{aB}	4,38 ^{aA}	2,39 ^{aC}	*** $(0,38)$
	p_E (SEM)	$nz(0,72)$	** $(0,59)$	*** $(0,45)$	** $(0,32)$	
<i>b</i> *	običajen	5,13 ^{AB}	6,71 ^A	3,91 ^B	1,77 ^{BC}	*** $(1,21)$
	<i>n</i> -3	5,92	5,67	6,21	6,26 ^a	$nz(1,13)$
	p_E (SEM)	$nz(1,10)$	$nz(0,88)$	$nz(1,38)$	** $(1,27)$	
tuji vonji	običajen	1,3	1,8	1,5	1,5	$nz(0,18)$
	<i>n</i> -3	1,0 ^B	1,5 ^A	1,5 ^A	1,5 ^A	*** (0)
	p_E (SEM)	$nz(0,17)$	$nz(0,18)$	-	-	
žarkost	običajen	1,0	1,0	1,0	1,0	-
	<i>n</i> -3	1,0	1,0	1,0	1,0	-
	p_E (SEM)	-	-	-	-	
WOF	običajen	1,0 ^B	1,5 ^{aA}	1,3 ^{AB}	1,3 ^{AB}	$nz(0,17)$
	<i>n</i> -3	1,0	1,0 ^b	1,3	1,0	$nz(0,13)$
	p_E (SEM)	-	*** (0)	$nz(0,25)$	$nz(0,17)$	
tuje arome	običajen	1,0 ^{bC}	3,3 ^{aA}	1,8 ^B	2,0 ^{aB}	*** $(0,18)$
	<i>n</i> -3	1,5 ^{aC}	2,5 ^{bA}	2,0 ^B	1,5 ^{bC}	*** (0)
	p_E (SEM)	*** (0)	** $(0,18)$	$nz(0,17)$	*** (0)	
TBK sveži	običajen	0,22	0,20	0,17	0,19	$nz(0,00)$
	<i>n</i> -3	0,24 ^A	0,16 ^B	0,13 ^B	0,15 ^B	** $(0,01)$
	p_E (SEM)	$nz(0,01)$	$nz(0,03)$	$nz(0,01)$	$nz(0,02)$	
TBK TO	običajen	0,23 ^{bC}	0,39 ^{bB}	0,47 ^A	0,45 ^{AB}	** $(0,03)$
	<i>n</i> -3	0,48 ^{aB}	0,76 ^{aA}	0,37 ^B	0,41 ^B	** $(0,06)$
	p_E (SEM)	** $(0,02)$	* $(0,05)$	$nz(0,03)$	$nz(0,07)$	

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, $nz - p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; p_N , statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A,B,C,D}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod); p_E , statistična verjetnost vpliva *n*-3-obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi in *n*-3-obogatenimi mini fileji)

without - carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, * $p \leq 0.05$ statistically significant, $nz - p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; p_N , statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A,B,C,D}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different juniper berries extract carriers); p_E , statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (^{a,b}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between control and *n*-3-enriched chicken inner fillets)

Priloga C.20: Vpliv načina pakiranja (modificirano in vakuumsko) na instrumentalno izmerjeno barvo in oksidacijo lipidov (TBK) na presnih ter senzorične lastnosti na dvoploščnem žaru pečenih (temperatura plošč 220 °C, 5 min) običajnih in *n*-3–obogatenih piščančjih mini filejev, mariniranih z ekstraktom brinovih jagod, vezanim na različne nosilce, po devetdnevem skladiščenju pri temperaturi (4 ±1) °C

Annex C.20: Effect of packing (modified and vacuum) on instrumental colour values and lipid oxidation parameter (TBARs) of raw, as well as sensory properties after roasting on two-platted grill (plate temperature 220 °C, 5 min) of control and *n*-3–enriched chicken inner fillets, marinated with juniper berries extract bounded on different carriers, after 9 days of storing at (4 ±1) °C

Parameter	pakiranje	Obogatitev običajen				<i>n</i> -3			
		kontrola	olje	škrob	sol	kontrola	olje	škrob	sol
<i>L</i> *	MAP	56,98	53,39	55,87	56,34	54,56	51,65	49,94	52,24
	VP	52,83	55,04	52,17	56,92	54,56	51,18	50,68	55,26
	<i>p</i> _P (SEM)	nz(3,79)	nz(3,63)	nz(2,80)	nz(3,03)	nz(4,86)	nz(3,93)	nz(1,14)	nz(3,67)
<i>a</i> *	MAP	0,96	1,32	0,37 ^b	0,73	2,57	1,30 ^b	0,63 ^b	0,20 ^b
	VP	2,08	1,44	2,12 ^a	1,22	2,37	3,45 ^a	4,38 ^a	2,39 ^a
	<i>p</i> _P (SEM)	nz(0,88)	nz(0,84)	*(0,78)	nz(0,58)	nz(0,21)	** (0,71)	*** (0,54)	*** (0,18)
<i>b</i> *	MAP	7,86 ^a	6,63	4,97	6,81 ^a	8,02	6,67	7,24	7,85
	VP	5,13 ^b	6,71	3,91	1,77 ^b	5,92	5,67	6,21	6,26
	<i>p</i> _P (SEM)	*(1,54)	nz(1,01)	nz(2,13)	** (1,46)	nz(1,96)	nz(0,76)	nz(1,47)	nz(1,09)
tuji vonji	MAP	1,0	2,0	1,3	1,3	1,3	1,5	1,3	1,0 ^b
	VP	1,3	1,8	1,5	1,5	1,0	1,5	1,5	1,5 ^a
	<i>p</i> _P (SEM)	-(0,18)	nz(0,2)	nz(0,2)	nz(0,2)	nz(0,2)	-	nz(0,2)	*** (0)
žarkost	MAP	1,0	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	VP	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	<i>p</i> _P (SEM)	-	nz(0,2)	-	-	-	-	-	-
WOF	MAP	1,0	1,3	1,0	1,0	1,0	2,5 ^a	1,0	1,0
	VP	1,0	1,5	1,3	1,3	1,0	1,0 ^b	1,3	1,0
	<i>p</i> _P (SEM)	-	nz(0,2)	nz(0,2)	nz(0,2)	-	*** (0)	nz(0,2)	-
tuje arome	MAP	1,0	3,3	2,0	1,5 ^b	1,0 ^b	3,0 ^a	1,5 ^b	1,5
	VP	1,0	3,3	1,8	2,0 ^a	1,5 ^a	2,5 ^b	2,0 ^a	1,5
	<i>p</i> _P (SEM)	-	nz(0,3)	nz(0,2)	*** (0)	*** (0)	*** (0)	*** (0)	-
TBK sveži	MAP	0,38 ^a	0,36 ^a	0,21	0,25	0,30 ^a	0,43 ^a	0,23 ^a	0,21
	VP	0,22 ^b	0,20 ^b	0,17	0,19	0,24 ^b	0,16 ^b	0,13 ^b	0,15
	<i>p</i> _P (SEM)	*(0,02)	*(0,03)	nz(0,03)	nz(0,02)	*(0,01)	** (0,01)	*(0,02)	nz(0,02)
TBK TO	MAP	0,19	0,31	0,33 ^b	0,32 ^b	0,36 ^b	0,28 ^b	0,32	0,34
	VP	0,23	0,39	0,47 ^a	0,45 ^a	0,48 ^a	0,76 ^a	0,37	0,41
	<i>p</i> _P (SEM)	nz(0,02)	nz(0,03)	(0,02)	*(0,02)	*(0,02)	** (0,03)	nz(0,04)	nz(0,09)

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: ****p* ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ***p* ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, **p* ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – *p* > 0,05 statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p*_P, statistična verjetnost vpliva pakiranja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med načini pakiranja)

without - carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: ****p* ≤ 0.001 very highly statistically significant, ***p* ≤ 0.01 highly statistically significant, **p* ≤ 0.05 statistically significant, nz – *p* > 0.05 statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p*_P, statistical probability of packing effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (^{a,b}) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of difference between MAP and VP packing).

Priloga C.21: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3-obogatitev) in različnih nosilcev (kontrola, olje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na vsebnost posameznih in skupnih oksidov holesterola (OH) in holesterola (mg/kg) ter obseg oksidacije (%) v mariniranih presnih vakuumsko pakiranih piščančjih mini filejih po devetdnevem skladiščenju pri temperaturi (4 ± 1) °C

Annex C.21: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and different juniper berries extract carriers (without, oil, starch and salt) on content of individual and total cholesterol oxides (OH) and cholesterol (mg kg⁻¹) as well as rate of oxidation (%) of marinated raw chicken inner fillets after 9 day of storing at (4 ± 1) °C and vacuum packed

OH	Obogatitev/nosilec	kontrola	olje	škrob	sol	<i>p_N</i> (SEM)
7 α -HC	običajen	8,05 ^{bA}	6,95 ^c	6,31 ^{cB}	14,55 ^{aA}	*** (0,48)
	<i>n</i> -3	5,20 ^{cB}	7,64 ^b	8,82 ^{aA}	2,51 ^{dB}	*** (0,33)
	<i>p_E</i> (SEM)	*** (0,34)	nz (0,37)	** (0,38)	*** (0,52)	
7 β -HC	običajen	8,14 ^{aA}	5,71 ^{bB}	3,90 ^{dB}	4,62 ^{cA}	*** (0,29)
	<i>n</i> -3	3,33 ^{cB}	6,50 ^{bA}	10,57 ^{aA}	1,19 ^{dB}	*** (0,32)
	<i>p_E</i> (SEM)	*** (0,31)	*(0,31)	*** (0,40)	*** (0,17)	
20 α -HC	običajen	0,12 ^{dB}	0,37 ^{cA}	0,46 ^{bA}	1,13 ^{aA}	*** (0,03)
	<i>n</i> -3	0,79 ^{aA}	0,20 ^{bB}	0,00 ^{dB}	0,07 ^{cB}	*** (0,02)
	<i>p_E</i> (SEM)	*** (0,03)	*** (0,01)	*** (0,02)	*** (0,04)	
22-HC	običajen	6,45 ^{aB}	6,81 ^a	4,40 ^{bA}	0,20 ^{cB}	*** (0,26)
	<i>n</i> -3	8,57 ^{aA}	6,84 ^b	2,80 ^{dB}	5,62 ^{cA}	*** (0,32)
	<i>p_E</i> (SEM)	** (0,38)	nz (0,34)	*** (0,18)	*** (0,20)	
25-HC	običajen	2,52 ^{aA}	0,69 ^{bB}	0,22 ^{cB}	0,18 ^{cA}	*** (0,07)
	<i>n</i> -3A	0,86 ^{cB}	10,04 ^{aA}	2,32 ^{bA}	0,12 ^{dB}	*** (0,26)
	<i>p_E</i> (SEM)	*** (0,09)	*** (0,36)	*** (0,08)	*** (0,01)	
skupni HO	običajen	25,29 ^{aA}	20,52 ^{bB}	15,29 ^{cB}	20,68 ^{bA}	*** (1,04)
	<i>n</i> -3	18,75 ^{cB}	31,22 ^{aA}	24,50 ^{bA}	9,50 ^{dB}	*** (1,12)
	<i>p_E</i> (SEM)	** (1,11)	*** (1,32)	*** (1,02)	*** (1,80)	
oksidacija (%)	običajen	3,04 ^{aA}	2,63 ^{cB}	1,88 ^{dB}	2,75 ^{bA}	*** (0,00)
	<i>n</i> -3	2,34 ^{cB}	3,80 ^{aA}	3,08 ^{bA}	1,24 ^{dB}	*** (0,00)
	<i>p_E</i> (SEM)	*** (0,00)	*** (0,00)	*** (0,00)	*** (0,00)	
holesterol	običajen	807,82	759,42	798,53	730,59	nz (38,74)
	<i>n</i> -3	781,34	790,62	770,41	755,47	nz (38,73)
	<i>p_E</i> (SEM)	nz (39,73)	nz (38,76)	nz (39,23)	nz (37,16)	

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_E*, statistična verjetnost vpliva *n*-3-obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med običajnimi mini fileji in *n*-3-obogatenimi mini fileji); *p_N*, statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod)

without – carrier (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0.001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0.01$ highly statistically significant, nz – $p > 0.05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_E*, statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within columns (^{a,b}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between control and *n*-3-enriched chicken inner fillets) *p_N*, statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D}) differ significantly ($p \leq 0.05$, significance of differences between different juniper berries extract carriers)

Priloga C.22: Vpliv načina pakiranja (modificirano in vakuumsko) na vsebnost posameznih in skupnih oksidov holesterola (OH) in holesterola (mg/kg) ter obseg oksidacije (%) v presnih mariniranih mini filejih piščancev, krmljenih z dodatkom mletega lanenega semena (*n-3*-obogatitev) in brez dodatka (običajen), po devetdnevem skladiščenju pri temperaturi (4 ±1) °C

Annex C.22: Effect of packing (modified and vacuum) on content of total cholesterol oxides (OH) and cholesterol (mg kg⁻¹) as well as rate of oxidation (%) of raw marinated chicken inner fillets, originated from chicken fed with ground whole flaxseed (*n-3* enriched) and without (control), after 9 days of storing at (4 ±1) °C

OH	Obogatitev					običajen			
	Nosilec/pakiranje	kontrola	olje	škrob	sol	kontrola	olje	škrob	sol
7α-HC	MAP	5,33 ^b	4,26 ^b	3,92 ^b	0,00 ^b	6,85 ^a	25,59 ^a	5,85 ^a	23,58 ^a
	VP	8,05 ^a	6,95 ^a	6,31 ^a	14,55 ^a	5,20 ^b	7,64 ^b	8,82 ^a	2,51 ^b
	<i>p_p</i> (SEM)	** (0,34)	** (0,29)	** (0,26)	*** (0,51)	** (0,30)	*** (0,94)	*(2,14)	*** (6,43)
7β-HC	MAP	6,37 ^b	55,91 ^a	27,22 ^a	10,22 ^a	6,66 ^a	87,49 ^a	3,33 ^b	18,94 ^a
	VP	8,14 ^a	5,71 ^b	3,90 ^b	4,62 ^b	3,33 ^b	6,50 ^b	10,57 ^a	1,19 ^b
	<i>p_p</i> (SEM)	** (0,37)	*** (1,99)	*** (0,97)	*** (0,40)	** (0,26)	*** (3,10)	*** (0,88)	*** (0,67)
20α-HC	MAP	0,08 ^b	1,93 ^a	3,48 ^a	1,34 ^a	0,62 ^b	0,61 ^a	0,28 ^a	1,14 ^a
	VP	0,12 ^a	0,37 ^b	0,46 ^b	1,13 ^b	0,79 ^a	0,20 ^b	0,00 ^b	0,07 ^b
	<i>p_p</i> (SEM)	** (0,01)	*** (0,07)	*** (0,12)	*(0,06)	** (0,71)	*** (0,02)	*(0,16)	*** (0,04)
22-HC	MAP	0,69 ^b	6,59 ^a	0,80 ^b	13,10 ^a	5,34 ^b	12,02 ^a	13,74 ^a	14,09 ^a
	VP	6,45 ^a	6,81 ^a	4,40 ^a	0,20 ^b	8,57 ^a	6,84 ^b	2,80 ^b	5,62 ^b
	<i>p_p</i> (SEM)	*** (0,23)	nz (0,34)	*** (0,16)	*** (0,46)	** (0,36)	** (0,49)	** (3,47)	*** (0,54)
25-HC	MAP	0,58 ^b	16,06 ^a	1,87 ^a	22,29 ^a	0,00 ^b	11,57 ^a	0,95 ^b	0,88 ^a
	VP	2,52 ^a	0,69 ^b	0,22 ^b	0,18 ^b	0,86 ^a	10,04 ^b	2,32 ^a	0,12 ^b
	<i>p_p</i> (SEM)	*** (0,09)	*** (0,57)	*** (0,07)	*** (0,79)	*** (0,03)	*(0,54)	*(0,85)	*** (0,03)
skupni OH	MAP	13,06 ^b	84,76 ^a	37,30 ^a	46,95 ^a	19,47 ^a	137,28 ^a	24,15 ^a	58,62 ^a
	VP	25,29 ^a	20,52 ^b	15,29 ^b	20,68 ^b	18,75 ^a	31,22 ^b	24,50 ^a	9,50 ^b
	<i>p_p</i> (SEM)	** (1,01)	*** (3,08)	*** (1,43)	*** (1,81)	nz (0,96)	*** (4,98)	nz (5,59)	*** (2,10)
oksidacija (%)	MAP	1,77 ^b	9,60 ^a	4,40 ^a	5,92 ^a	2,58 ^a	14,21 ^a	3,00 ^a	6,56 ^a
	VP	3,04 ^a	2,63 ^b	1,88 ^b	2,75 ^b	2,34 ^b	3,80 ^b	3,08 ^a	1,24 ^b
	<i>p_p</i> (SEM)	*** (0,00)	*** (0,00)	*** (0,00)	*** (0,00)	*** (0,00)	*** (0,00)	nz (0,60)	*** (0,00)
holesterol	MAP	726,6	797,7	811,1	745,6	736,7	828,8	778,1	834,4
	VP	807,8	759,4	798,5	730,6	781,3	790,6	770,4	755,5
	<i>p_p</i> (SEM)	nz (38,41)	nz (38,94)	nz (40,24)	nz (36,91)	nz (37,97)	nz (40,50)	nz (46,3)	nz (39,80)

MAP – pakiranje v modificirano atmosfero; VP – vakuumsko pakiranje; kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_p*, statistična verjetnost vpliva pakiranja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a,b}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$); značilnost razlik med načini pakiranja) MAP – modified atmosphere packing; VP – vacuum packing; control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: *** $p \leq 0,001$ very highly statistically significant, ** $p \leq 0,01$ highly statistically significant, * $p \leq 0,05$ statistically significant, nz – $p > 0,05$ statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_p*, statistical probability of packing effect; means with a different superscript within columns (^{a,b}) differ significantly ($p \leq 0,05$, significance of difference between MAP and VP packing)

Priloga C.23: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3-obogatitev) in različnih nosilcev (kontrola, olje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na vsebnost kreatina, kreatinina in skupnega kreatina (mMol/kg) v presnih mariniranih vakuumsko pakiranih piščančjih mini filejih po devetdnevem skladiščenju pri temperaturi (4 ± 1) °C

Annex C.23: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and different juniper berries extract carriers on content of creatine, creatinine and total creatine (mMol kg⁻¹) of raw marinated chicken inner fillets after 9 days of storing in vacuum and at temperature of (4 ± 1) °C

Parameter	Obogatitev/nosilec	kontrola	olje	škrob	sol	<i>p_N</i> (SEM)
kreatin	običajen	9,84 ^B	9,68 ^B	9,60 ^B	10,90 ^A	*(0,50)
	<i>n</i> -3	10,38	10,49	9,95	10,13	nz(0,51)
	<i>p_E</i> (SEM)	nz(0,02)	nz(0,02)	nz(0,49)	nz(0,03)	
kreatinin	običajen	0,46 ^B	0,46 ^B	0,44 ^B	0,52 ^A	*(0,02)
	<i>n</i> -3	0,49	0,48	0,46	0,49	nz(0,02)
	<i>p_E</i> (SEM)	nz(0,53)	nz(0,53)	nz(0,51)	nz(0,55)	
skupni kreatin	običajen	10,31 ^B	10,14 ^B	10,04 ^B	11,42 ^A	*(0,52)
	<i>n</i> -3	10,87	10,97	10,41	10,62	nz(0,54)
	<i>p_E</i> (SEM)	nz(0,51)	nz(0,50)	nz(0,02)	nz(0,53)	

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: **p* ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – *p* > 0,05 statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_N*, statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod); *p_E*, statistična verjetnost vpliva *n*-3-obogatenja krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med običajnimi in *n*-3-obogatenimi piščančjimi mini fileji)

control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: **p* ≤ 0.05 statistically significant, nz – *p* > 0.05 statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_N*, statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D}) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of differences between different juniper berries extract carriers); *p_E*, statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within columns (^{a, b}) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of differences between control and *n*-3-enriched chicken inner fillets)

Priloga C.24: Vpliv načina pakiranja (modificirano in vakuumsko) na vsebnost kreatina, kreatinina in skupnega kreatina (mMol/kg) v presnih običajnih in *n*-3-obogatenih piščančjih mini filejih, mariniranih z ekstraktom brinovih jagod, vezanih na različne nosilce (kontrola, olje, škrob, sol), po devetdnevem skladiščenju pri temperaturi (4 ± 1) °C

Annex C.24: Effect of packing (modified and vacuum) on content of creatine, creatinine and total creatine (mMol kg⁻¹) of raw marinated chicken inner fillets, control and *n*-3 enriched, marinated with juniper berries extract bounded on different carriers (without, oil, starch, salt), after 9 days of storing at (4 ± 1) °C

Parameter	Obogatitev Pakiranje/nosilec	običajen				<i>n</i> -3			
		kontrola	olje	škrob	sol	kontrola	olje	škrob	sol
kreatin	MAP	9,49	8,46 ^b	9,34 ^a	10,86 ^a	8,49	8,35 ^b	8,18	9,84
	VP	9,84	9,60 ^a	10,38 ^a	9,95 ^a	9,68	10,90 ^a	10,49	10,13
	<i>p_P</i> (SEM)	nz(0,48)	*(0,46)	*(0,45)	** (0,49)	nz(0,49)	** (0,47)	nz(0,52)	nz(0,50)
kreatinin	MAP	0,46	0,39 ^b	0,45 ^b	0,52 ^a	0,39	0,39 ^b	0,39 ^b	0,45
	VP	0,46	0,44 ^a	0,49 ^a	0,46 ^b	0,46	0,52 ^a	0,48 ^a	0,49
	<i>p_P</i> (SEM)	nz(0,02)	*(0,02)	*(0,02)	** (0,02)	nz(0,02)	** (0,02)	*(0,02)	nz(0,02)
skupni kreatin	MAP	9,96	8,85 ^b	9,79	11,38	8,88	8,73 ^b	8,57	10,29
	VP	10,31	10,04 ^a	10,87	10,41	10,14	11,42 ^a	10,97	10,62
	<i>p_P</i> (SEM)	nz(0,51)	*(0,48)	nz(0,47)	nz(0,51)	nz(0,52)	** (0,49)	nz(0,55)	nz(0,52)

MAP – pakiranje v modificirano atmosfero; VP – vakuumsko pakiranje; kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: ***p* ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, **p* ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – *p* > 0,05 statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_P*, statistična verjetnost vpliva pakiranja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med načini pakiranja)

MAP – modified atmosphere packing; VP – vacuum packing; control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: ***p* ≤ 0.01 highly statistically significant, **p* ≤ 0.05 statistically significant, nz – *p* > 0.05 statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_P*, statistical probability of packing effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (a, b) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of difference between MAP and VP packing)

Priloga C.25: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3-obogatitev) in različnih nosilcev (kontrola, olje, škrob, sol) ekstrakta brinovih jagod na vsebnost posameznih in skupnih HAA (ng/kg) v vakuumsko pakiranih mariniranih piščančjih mini filejih, pečenih na dvoploščnem žaru, po devetdnevem skladiščenju pri temperaturi (4 ± 1) °C

Annex C.25: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and different of juniper berries extract carriers on content of individual and total HAA (ng kg⁻¹) of vacuum packed marinated chicken inner fillets thermally treated on two-plated grill after 9 days of storing at temperature of (4 ± 1) °C

HAA	Obogatitev/nosilec	kontrola	olje	škrob	sol	<i>p_N</i> (SEM)
AαC	običajen	0	0	0	0	-(0)
	<i>n</i> -3	0	0	0	0	-(0)
	<i>p_E</i> (SEM)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	
4,8-DiMeIQ	običajen	23 ^A	8 ^B	26 ^{aA}	12 ^B	** (6)
	<i>n</i> -3	14 ^A	5 ^{CB}	3 ^{bC}	9 ^B	** (3)
	<i>p_E</i> (SEM)	nz(8)	nz(1)	*** (1)	nz(2)	
7,8-DiMeIQ	običajen	13 ^{aA}	6 ^C	8 ^{aB}	13 ^{aA}	*** (1)
	<i>n</i> -3	10 ^{bA}	7 ^{BC}	5 ^{bC}	9 ^{bAB}	** (1)
	<i>p_E</i> (SEM)	*** (1)	nz(1)	* (1)	* (1)	
Glu-P-2	običajen	125 ^A	76 ^{bB}	75 ^{aB}	139 ^{aA}	*** (18)
	<i>n</i> -3	97 ^A	86 ^{aA}	54 ^{bB}	45 ^{bB}	*** (7)
	<i>p_E</i> (SEM)	nz(23)	* (4)	*** (3)	*** (4)	
harman	običajen	83 ^{AB}	9 ^{aB}	134 ^{aA}	5 ^B	* (57)
	<i>n</i> -3	4	5 ^b	4 ^b	5	nz(1)
	<i>p_E</i> (SEM)	nz(71)	*** (0)	*** (5)	nz(1)	
IQ	običajen	0	0	0	0	-(0)
	<i>n</i> -3	0	0	0	0	-(0)
	<i>p_E</i> (SEM)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	
MeIQ	običajen	221 ^{aA}	118 ^{aB}	143 ^{aB}	206 ^{aA}	*** (27)
	<i>n</i> -3	114 ^{bA}	93 ^{bB}	63 ^{bC}	54 ^{bC}	*** (10)
	<i>p_E</i> (SEM)	*** (22)	* (9)	*** (5)	** (36)	
MeIQx	običajen	612 ^A	270 ^{bC}	362 ^{aB}	665 ^{aA}	*** (48)
	<i>n</i> -3	523 ^A	402 ^{aAB}	256 ^{bB}	388 ^{bAB}	* (79)
	<i>p_E</i> (SEM)	nz(89)	** (33)	** (27)	** (56)	
norharman	običajen	241 ^A	151 ^B	164 ^{aB}	258 ^{aA}	*** (26)
	<i>n</i> -3	245 ^A	158 ^B	126 ^{bB}	135 ^{bB}	** (26)
	<i>p_E</i> (SEM)	nz(41)	nz(6)	** (8)	*** (15)	
PhIP	običajen	4926 ^{aA}	2458 ^{bC}	3302 ^{aB}	4541 ^{aA}	*** (442)
	<i>n</i> -3	3608 ^{bA}	2762 ^{aB}	1650 ^{bC}	2018 ^{bC}	*** (374)
	<i>p_E</i> (SEM)	* (656)	* (114)	*** (172)	*** (148)	
vsota	običajen	6249 ^{aA}	3096 ^C	4215 ^{aB}	5845 ^{aA}	*** (413)
	<i>n</i> -3	4615 ^{bA}	3526 ^B	2161 ^{bC}	2665 ^{bCB}	** (494)
	<i>p_E</i> (SEM)	* (695)	* (158)	*** (215)	*** (207)	

kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: ****p* ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ***p* ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, **p* ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – *p* > 0,05 statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_N*, statistična verjetnost vpliva nosilca ekstrakta brinovih jagod; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta brinovih jagod); *p_E*, statistična verjetnost vpliva *n*-3-obogatitve krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med običajnimi in *n*-3-obogatenimi piščančjimi mini fileji)

control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: ****p* ≤ 0,001 very highly statistically significant, ***p* ≤ 0,01 highly statistically significant, **p* ≤ 0,05 statistically significant, nz – *p* > 0.05 statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_N*, statistical probability of juniper berries extract carriers effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D}) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of differences between different juniper berries extract carriers); *p_E*, statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within columns (^{a, b}) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of differences between control and *n*-3-enriched chicken inner fillets)

Priloga C.26: Vpliv načina pakiranja (modificirano in vakuumsko) na vsebnost posameznih in skupnih HAA (ng/kg) v običajnih in *n*-3–obogatenih piščančjih mini filejih, mariniranih z ekstraktom brinovih jagod, vezanim na različne nosilce (kontrola, olje škrob, sol), pečenih na dvoploščnem žaru po devetdnevem skladiščenju pri temperaturi (4 ±1) °C

Annex C.26: Effect of packing (modified and vacuum) on content of individual and total HAA (ng kg⁻¹) of control and *n*-3 enriched chicken inner fillets, marinated with juniper berries extract bounded on different carriers (without, oil, starch, salt) and thermally treated on two-plated grill, after 9 days of storing at (4 ±1) °C

HAA	Obogatitev običajen				<i>n</i> -3				
	Nosilec/pakiranje	kontrola	olje	škrob	sol	kontrola	olje	škrob	sol
AαC	MAP	0	0	0	0	0	0	0	0
	VP	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>p</i> _P (SEM)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)
4,8-DiMeIQ	MAP	7 ^B	7	11 ^B	11	6 ^B	2	7	1 ^B
	VP	23 ^A	8	26 ^A	12	14 ^A	5	3	9 ^A
	<i>p</i> _P (SEM)	* (7)	nz(0)	*** (2)	nz(1)	* (3)	nz(2)	nz(3)	** (2)
7,8-DiMeIQ	MAP	7 ^B	6	9 ^A	10 ^B	7 ^B	8	9 ^A	39
	VP	13 ^A	6	8 ^B	13 ^A	10 ^A	7	5 ^B	9
	<i>p</i> _P (SEM)	*** (1)	nz(0)	** (0)	* (1)	* (1)	nz(1)	* (2)	nz(16)
Glu-P-2	MAP	64 ^B	56 ^B	96 ^A	109 ^B	43 ^B	71 ^B	69	42
	VP	125 ^A	76 ^A	75 ^B	139 ^A	97 ^A	86 ^A	54	45
	<i>p</i> _P (SEM)	** (22)	** (3)	* (8)	** (7)	** (10)	** (3)	nz(13)	nz(2)
harman	MAP	8	61 ^A	7 ^B	12 ^A	4	3	6	13 ^A
	VP	83	9 ^B	134 ^A	5 ^B	4	5	4	5 ^B
	<i>p</i> _P (SEM)	nz(71)	*** (2)	*** (5)	** (2)	nz(2)	nz(2)	nz(2)	** (1)
IQ	MAP	0	0	0	0	0	0	0	0
	VP	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>p</i> _P (SEM)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-(0)
MeIQ	MAP	473 ^A	135 ^A	154	100 ^B	53 ^B	114 ^A	79	84 ^A
	VP	221 ^B	118 ^B	143	206 ^A	114 ^A	93 ^B	63	54 ^B
	<i>p</i> _P (SEM)	* (121)	* (6)	nz(6)	* (36)	** (12)	* (9)	nz(12)	*** (2)
MeIQx	MAP	416 ^B	256	585 ^A	569	315	341	487 ^A	952 ^A
	VP	612 ^A	270	362 ^B	665	523	402	256 ^B	388 ^B
	<i>p</i> _P (SEM)	** (54)	nz(13)	*** (18)	nz(55)	nz(107)	nz(32)	** (49)	*** (19)
norharman	MAP	163 ^B	105 ^B	254 ^A	186 ^B	123 ^B	143 ^B	171 ^A	16 ^B
	VP	241 ^A	151 ^A	164 ^B	258 ^A	245 ^A	158 ^A	126 ^B	135 ^A
	<i>p</i> _P (SEM)	* (32)	*** (6)	** (18)	*** (7)	* (33)	** (3)	** (11)	*** (15)
PhIP	MAP	2829 ^B	2036 ^B	3913 ^A	3518 ^B	2230 ^B	2373 ^B	2661 ^A	1914
	VP	4926 ^A	2458 ^A	3302 ^B	4541 ^A	3608 ^A	2762 ^A	1650 ^B	2018
	<i>p</i> _P (SEM)	*** (544)	* (113)	** (131)	*** (128)	* (499)	** (79)	*** (136)	nz(148)
vsota	MAP	3968 ^B	2668 ^B	5032 ^A	4516 ^B	2782 ^B	3055 ^B	3491 ^A	3064
	VP	6249 ^A	3096 ^A	4215 ^B	5845 ^A	4615 ^A	3526 ^A	2161 ^B	2665
	<i>p</i> _P (SEM)	*** (516)	* (145)	** (166)	*** (155)	* (665)	** (119)	*** (183)	nz(184)

MAP – pakiranje v modificirano atmosfero; VP – vakuumsko pakiranje; kontrola – nosilci (olje, škrob, sol) brez dodanega ekstrakta; značilnost vpliva: ****p* ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ***p* ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, **p* ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – *p* > 0,05 statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p*_P, statistična verjetnost vpliva pakiranja; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^a^b) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med načini pakiranja) MAP – modified atmosphere packing; VP – vacuum packing; control – carriers (oil, starch, salt) without extract; levels of significance: ****p* ≤ 0.001 very highly statistically significant, ***p* ≤ 0.01 highly statistically significant, **p* ≤ 0.05 statistically significant, nz – *p* > 0.05 statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p*_P, statistical probability of packing effect; means with a different superscript within columns (per parameter) (a, b) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of difference between MAP and VP packing)

Priloga D: Sklop IV: Različni aerobni pogoji v embalažni enoti in njihov vpliv na tvorbo produktov oksidacije in HAA v komercialnih piščančjih sekljancih, obogatenih z *n*-3 VNMK

Annex D: Part IV: Different aerobic conditions in a packaging unit and their influence on the formation of oxidation products and HAA in commercial chicken patties, enriched with *n*-3 PUFA

Priloga D.1: Vpliv dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3-obogatitev) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osemdnevnim skladiščenjem pri temperaturi (4 ± 1) °C na vsebnost holesterola, posameznih in skupnih oksidov holesterola (OH, mg/kg) po pečenju na dvoploščnem žaru

Annex D.1: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and different package-atmosphere conditions during 8 days of storing at (4 ± 1) °C on content of cholesterol and cholesterol oxides (OH, mg kg⁻¹) of chicken patties, thermally treated at two-plated grill

Parameter	Obogatitev	Atmosfera v embalažnih enotah				<i>p_P</i> (SEM)
		MAP-hCO ₂	WF-ICO ₂	MAP-hO ₂	MAP-IO ₂	
7α-HC	običajen	0,86 ^{BCb}	1,90 ^{Bb}	13,89 ^A	0,12 ^{Cb}	*** (1,09)
	<i>n</i> -3	1,25 ^{BCa}	2,96 ^{Ba}	14,43 ^A	0,65 ^{Ca}	*** (1,71)
	<i>p_E</i> (SEM)	*** (0,17)	** (0,48)	nz (2,79)	*** (0,09)	
7β-HC	običajen	1,71 ^{BCb}	3,68 ^{Bb}	27,84 ^A	0,28 ^{Cb}	*** (2,21)
	<i>n</i> -3	2,51 ^{BCa}	5,90 ^{Ba}	28,87 ^A	1,30 ^{Ca}	*** (3,44)
	<i>p_E</i> (SEM)	** (0,37)	** (0,90)	nz (5,99)	*** (0,21)	
20α-HC	običajen	1,74 ^{Bb}	3,44 ^{Bb}	27,74 ^A	0,36 ^{Bb}	*** (2,05)
	<i>n</i> -3	2,41 ^{BCa}	5,88 ^{Ba}	28,84 ^A	1,32 ^{Ca}	*** (3,40)
	<i>p_E</i> (SEM)	* (0,38)	** (0,88)	nz (5,925)	*** (0,26)	
22-HC	običajen	0,83 ^{Bb}	1,78 ^{Bb}	14,59 ^A	0,19 ^{Bb}	*** (1,37)
	<i>n</i> -3	1,19 ^{Ba}	2,95 ^{Ba}	14,43 ^A	0,70 ^{Ba}	*** (1,74)
	<i>p_E</i> (SEM)	** (0,15)	** (0,45)	nz (3,12)	*** (0,16)	
25-HC	običajen	0,78 ^{Bb}	1,76 ^{Bb}	14,70 ^A	0,12 ^{Bb}	*** (1,35)
	<i>n</i> -3	1,27 ^{BCa}	3,00 ^{Ba}	14,45 ^A	0,59 ^{Ca}	*** (1,72)
	<i>p_E</i> (SEM)	** (0,24)	*** (0,44)	nz (3,08)	** (0,18)	
skupni OH	običajen	5,91 ^{BCb}	12,83 ^{Bb}	97,31 ^A	1,08 ^{Cb}	*** (7,49)
	<i>n</i> -3	8,63 ^{BCa}	20,69 ^{Ba}	101,02 ^A	4,56 ^{Ca}	*** (12,1)
	<i>p_E</i> (SEM)	** (1,24)	** (3,17)	nz (20,2)	*** (0,76)	
holesterol	običajen	573,34 ^A	567,46 ^A	493,94 ^B	578,36 ^A	*** (95,1)
	<i>n</i> -3	570,35 ^A	562,90 ^A	497,34 ^B	577,92 ^A	*** (12,8)
	<i>p_E</i> (SEM)	nz (3,62)	nz (8,83)	nz (19,2)	nz (4,73)	

MAP-hCO₂, veliko CO₂; WF-ICO₂, zavijanje v folijo, prepustno za zrak; MAP-hO₂, veliko O₂; MAP-IO₂, malo O₂; značilnost vpliva:

****p* ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, ***p* ≤ 0,01 statistično visoko značilen vpliv, **p* ≤ 0,05 statistično značilen vpliv, nz – *p* > 0,05 statistično neznačilen vpliv; SEM, standardna napaka povprečja; *p_P*, statistična verjetnost vpliva atmosfere v embalažni enoti; *p_E*, statistična verjetnost vpliva *n*-3-obogatenja krme; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{A, B, C, D, E}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med različnimi atmosferami v embalažni enoti); vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{a, b}) se statistično značilno razlikujejo (*p* ≤ 0,05; značilnost razlik med običajnimi in *n*-3-obogatenimi sekljanci)

MAP-hCO₂, high CO₂; WF-ICO₂, wrapping, air permeable; MAP-hO₂, high O₂; MAP-IO₂, low O₂; levels of significance: ****p* ≤ 0.001 very highly statistically significant, ***p* ≤ 0.01 highly statistically significant, **p* ≤ 0.05 statistically significant, nz – *p* > 0.05 statistically not significant; SEM, standard error of mean; *p_P*, statistical probability of package-atmosphere composition effect; *p_E*, statistical probability of enrichment effect; means with a different superscript within rows (^{A, B, C, D, E}) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of differences between different package-atmosphere conditions); means with a different superscript within columns (per parameter) (^{a, b}) differ significantly (*p* ≤ 0.05, significance of differences between control and *n*-3-enriched patties).

Priloga D.2: Vpliva dodatka mletega lanenega semena v prehrano piščancev (*n*-3-obogatitve mesa) in sestave atmosfere v embalažni enoti med osemdnevnim skladiščenjem pri temperaturi (4 ±1) °C na vsebnost prekurzorjev HAA (mMol/kg) presnih sekljancev ter vsebnost posameznih in skupnih HAA (µg kg⁻¹) po pečenju sekljancev na dvoploščnem žaru

Annex D.2: Effects of ground whole flaxseed addition in chicken feed (*n*-3 enriched) and different package-atmosphere conditions during 8 days of storing at (4 ±1) °C on content of HA precursors (mMol kg⁻¹) in raw, as well as individual and total HAA content (µg kg⁻¹) of chicken patties, thermally treated at two-plated grill

Parameter	Obogatitev	Atmosfera v embalažnih enotah				<i>p</i> _F (SEM)
		MAP-hCO ₂	WF-ICO ₂	MAP-hO ₂	MAP-IO ₂	
kreatin	običajen	5,60 ^B	6,10 ^A	6,54 ^A	5,26 ^B	*** (0,41)
	<i>n</i> -3	5,83 ^B	5,76 ^B	6,75 ^A	5,40 ^B	** (0,57)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (0,54)	nz (0,54)	nz (0,33)	nz (0,45)	
kreatinin	običajen	0,47	0,52	0,52	0,49	nz (0,14)
	<i>n</i> -3	0,53	0,46	0,57	0,48	nz (0,16)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (0,13)	nz (0,13)	nz (0,00)	nz (0,01)	
skupni kreatin	običajen	6,07 ^B	6,62 ^A	7,06 ^A	5,75 ^B	*** (0,46)
	<i>n</i> -3	6,36 ^B	6,21 ^B	7,32 ^A	5,88 ^B	** (0,60)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (0,59)	nz (0,58)	nz (0,35)	nz (0,46)	
MeIQ	običajen	0,196 ^{AB}	0,379 ^A	0,031 ^B	0,305 ^{AB}	nz (0,379)
	<i>n</i> -3	0,531	0,199	0,060	0,151	nz (0,723)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (0,979)	nz (0,302)	nz (0,059)	nz (0,367)	
MeIQx	običajen	6,116 ^A	3,303 ^{AB}	0,872 ^B	6,717 ^A	* (5,302)
	<i>n</i> -3	5,489 ^A	2,946 ^{AB}	1,394 ^B	5,390 ^A	* (4,222)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (5,588)	nz (3,703)	nz (1,292)	nz (5,910)	
PhIP	običajen	4,100 ^A	1,568 ^{AB}	0,611 ^B	3,856 ^{AB}	nz (4,155)
	<i>n</i> -3	3,091 ^{AB}	1,344 ^B	1,069 ^B	5,182 ^A	* (3,848)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (4,395)	nz (1,432)	nz (0,594)	nz (5,979)	
harman	običajen	2,194 ^A	1,085 ^B	1,469 ^{AB}	2,134 ^A	* (1,170)
	<i>n</i> -3	1,584 ^B	1,062 ^B	1,392 ^B	2,256 ^A	** (0,916)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (1,119)	nz (0,763)	nz (0,521)	nz (1,380)	
norharman	običajen	2,560 ^A	0,735 ^{Bb}	2,133 ^A	2,411 ^A	*** (1,283)
	<i>n</i> -3	2,008 ^A	1,152 ^{Ba}	1,758 ^{AB}	2,550 ^A	*** (1,120)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (1,395)	* (0,559)	nz (0,558)	nz (1,637)	
4,8-DiMeIQ	običajen	0,400 ^A	0,428 ^{Aa}	0,085 ^B	0,366 ^A	nz (0,373)
	<i>n</i> -3	0,431 ^A	0,195 ^{BCb}	0,119 ^C	0,333 ^{AB}	* (0,271)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (0,419)	* (0,291)	nz (0,070)	nz (0,332)	
7,8-DiMeIQ	običajen	0,234 ^A	0,075 ^B	0,093 ^B	0,243 ^A	* (0,184)
	<i>n</i> -3	0,333 ^A	0,049 ^B	0,097 ^B	0,302 ^A	*** (0,221)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (0,266)	nz (0,077)	nz (0,050)	nz (0,263)	
Glu-P-2	običajen	0,351 ^{AB}	0,033 ^{Cb}	0,209 ^{BCb}	0,425 ^A	*** (0,272)
	<i>n</i> -3	0,295 ^{AB}	0,219 ^{Ba}	0,345 ^{ABa}	0,422 ^A	nz (0,238)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (0,269)	*** (0,127)	nz (0,202)	nz (0,346)	
IQ	običajen	0,124 ^A	0,042 ^B	0,049 ^B	0,128 ^A	* (0,100)
	<i>n</i> -3	0,152 ^A	0,056 ^B	0,082 ^B	0,102 ^{AB}	* (0,089)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (0,139)	nz (0,638)	nz (0,075)	nz (0,089)	
IQx	običajen	1,234 ^A	0,209 ^{Bb}	0,939 ^{AB}	1,583 ^A	*** (1,265)
	<i>n</i> -3	0,738	0,892 ^a	0,513	1,403	nz (1,376)
	<i>p</i> _E (SEM)	nz (1,587)	*** (0,638)	nz (0,692)	nz (1,729)	
vsota	običajen	17,509 ^{Aa}	7,856 ^B	6,492 ^B	18,170 ^A	*** (5,067)
	<i>n</i> -3	14,651 ^{Bb}	8,115 ^C	6,831 ^C	18,119 ^A	*** (4,104)
	<i>p</i> _E (SEM)	* (3,897)	nz (3,579)	nz (2,741)	nz (6,542)	

Legenda: glej prilogo D.1; legend: see annex D.1

Priloga E: Sestava medija in ostalih raztopin za gojenje celic HepG2 in raztopin pri testu komet
Annex E: The composition of the medium and solutions for growing cells HepG2 and in the Comet assay

Sestava medija za gojenje celic HepG2:

Sestavine	Količina (za 50 ml)	Proizvajalec	Kataloška številka
Williams medij E	41 ml	Sigma, ZDA	W-1878
fetalni goveji serum (FBS)	7,5 ml	PAA, Avstrija	A15-104
L-glutamin	1 ml	PAA, Avstrija	M11-010
penicilin/streptomycin	0,5 ml	PAA, Avstrija	P11-010

Sestava 0,1 % tripsina za odlepljanje celic HepG2:

Sestavine	Količina (za 500 ml)	Proizvajalec	Kataloška številka
tripsin	0,5 g	Sigma, ZDA	T-4174
EDTA	0,05 g	Sigma, ZDA	E5134-500G
NaCl	4 g	Merck, Nemčija	1.06404
KCl	0,2 g	Fluka, Nemčija	60130
D-glukoza monohidrat	0,5 g	Sigma-Aldrich, Nemčija	16301
NaHCO ₃	0,42 g	Sigma-Aldrich, Nemčija	S5761
destilirana voda	500 ml		

Raztopina za alkalno lizo celic (pH 10):

Sestavine	Količina (za 300 ml)	Proizvajalec	Kataloška številka
NaCl	43,92 g	Merck, Nemčija	1.06404
EDTA	11,16 g	Sigma, ZDA	E5134-500G
tris	0,36 g	Merck, Nemčija	1.08382
destilirana voda	dodamo 300 ml		
Triton-X 100	3 ml	Fluka, Nemčija	93420

1 % Triton-X 100 dodamo tik pred uporabo

Pufer za elektroforezo (pH 13):

Sestavine	Količina (za 1000 ml)	Proizvajalec	Kataloška številka
10 M NaOH	30 ml	Merck, Nemčija	1.06482
0,2 M EDTA	5 ml	Sigma, ZDA	E5134-500G
destilirana voda	965 ml		

Pufer za nevtralizacijo (pH 7,5):

Sestavine	Količina (za 300 ml)	Proizvajalec	Kataloška številka
tris	14,532 g	Merck, Nemčija	1.08382
destilirana voda	dodamo 300 ml		

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ana PENKO

**VPLIV RASTLINSKIH EKSTRAKTOV NA
ZMANJŠANJE VSEBNOSTI HETEROCIKLIČNIH
AROMATSKIH AMINOV IN OKSIDOV
HOLESTEROLA V TOPLOTNO OBDELANEM
PIŠČANČJEM MESU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015